

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/085294 A1(51) 国際特許分類: C08B 37/08, A61K 31/519, 47/48,
A61P 19/02 // C07D 475/10, C07K 5/00式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)
[JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号
Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003739

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 4 日 (04.03.2005)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池谷 仁志 (IKEYA,

(25) 国際出願の言語: 日本語

Hitoshi) [JP/JP]; 〒1948560 東京都町田市旭町 3 丁
目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社 中央研究所内
Tokyo (JP). 守川 忠志 (MORIKAWA, Tadashi) [JP/JP];
〒1948560 東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気
化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 高橋 浩
一 (TAKAHASHI, Koichi) [JP/JP]; 〒1948560 東京都
町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会
社 中央研究所内 Tokyo (JP). 田村 達也 (TAMURA,
Tatsuya) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁
目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 岡町
晃 (OKAMACHI, Akira) [JP/JP]; 〒4101123 静岡県裾
野市伊豆島田 8 2 2-1-A 1 0 3 Shizuoka (JP). 石澤
武宣 (ISHIZAWA, Takenori) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県

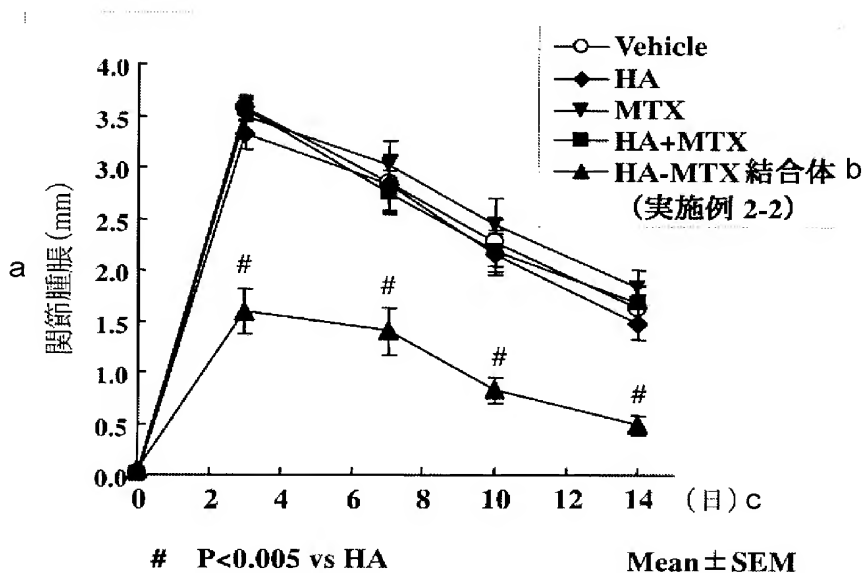
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-062616 2004 年 3 月 5 日 (05.03.2004) JP
特願2004-167755 2004 年 6 月 4 日 (04.06.2004) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 電
気化学工業株式会社 (DENKI KAGAKU KOGYO
KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1008455 東京都千
代田区有楽町 1 丁目 4 番 1 号 Tokyo (JP). 中外製薬株

[続葉有]

(54) Title: HYALURONIC ACID/METHOTREXATE COMPOUND

(54) 発明の名称: ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体



a...JOINT SWELLING (mm)

b.... HA/MTX COMPOUND (EXAMPLE 2-2)

c.... DAYS

(57) Abstract: A hyaluronic acid/methotrexate compound useful as a therapeutic agent for joint diseases. The hyaluronic acid/methotrexate compound useful as a therapeutic agent for joint diseases comprises hyaluronic acid and methotrexate bonded to a carboxy group of the acid through a linker having a peptide chain comprising one to eight amino acids.

[続葉有]

WO 2005/085294 A1



御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 佐藤 晴彦 (SATO, Haruhiko) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 樋口 義信 (HIGUCHI, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外(SHAMOTO, ICHIO et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明の課題は、関節疾患治療薬として有用な、ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を提供することである。この課題を解決する手段として、関節疾患治療薬として有用な、ヒアルロン酸のカルボキシル基に、1~8 個のアミノ酸からなるペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合した、ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を見出した。

明 細 書

ヒアルロン酸－メトトレキサート結合体

技術分野

[0001] 本発明はヒアルロン酸－メトトレキサート結合体、及びその医薬用途に関する。

背景技術

[0002] 変形性関節症(以下、OAとも称す)は加齢を基盤として発症する、いわゆる退行性疾患の一種である。高齢化社会の現在、患者数は増加の一途を辿っているが、未だ十分な診断法、治療法は確立されていない。OAで最初に起こる病態変化は、加齢によるメカニカルストレスが引き金となった関節軟骨の変性と磨耗であると考えられている。この変化は極めてゆるやかな速度で進行し徐々に痛みへと進展する。

[0003] 現在のOA薬物治療では、全身療法として、1)解熱鎮痛薬(アセトアミノフェン)、2)非ステロイド性抗炎症薬(以下、NSAIDsとも称す)、局所療法(関節内注入)として、3)ヒアルロン酸(以下、HAとも称す)製剤、および4)ステロイド製剤が使用されている。従来、NSAIDsをはじめとする全身的な薬物療法を行っても関節局所の疼痛や腫脹が軽快しない場合、抗炎症作用が最も優れているステロイド製剤の関節内注入が行われてきた。しかし、ステロイド製剤は、関節注入症候群(ステロイド関節症)や全身性の副作用など安全性の面で問題がある。そのため、ステロイド製剤に代わる安全な関節内注入剤として、HA製剤の有用性が高まりつつある。

[0004] HAは、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸との繰り返し単位より構成される生体内多糖である。HAは、関節液を構成する主成分として関節液の粘弾性、荷重吸収作用および潤滑作用の保持に働いており、また軟骨マトリックスにおいては、軟骨プロテオグリカンと結合してアグリカンと呼ばれる重合体を形成し、水分保持能と粘弾性の維持に中心的な役割を担っている。

[0005] 分子量約60万ダルトン以上のHAおよびその架橋物を膝関節内に注入するとOAの疼痛が除去されることから、HA製剤はOAの治療法の一つとして広く用いられている。また、正常関節液中のHAの分子量に近い高分子量タイプのHA製剤(商品名 スベニール(登録商標)、製造販売 中外製薬株式会社)は、日本において関節リ

ウマチ(以下、RAとも称す)に伴う膝の疼痛除去にも適用が認められている。なお、HAの分子量は薬効の強さと相関があり、高分子量タイプのHAの方が、低分子量タイプのHAよりも持続性に優れ、より強い薬効を示すと言われている。

[0006] 一般に、HA製剤は、OA(または関節リュウマチ(以下、RAとも称す))の病態で損なわれた関節液の粘性と弾性を正常に戻すことにより疼痛を除去していると考えられている。しかし、外部から加えたHA製剤は関節液中から数日以内には消失してしまうにもかかわらず、効果は長期間持続するため、上記の関節液の粘弾性改善とは異なる機序で疼痛除去に働いている可能性も示唆されている。そのような機序の1つとして、後述のOA滑膜炎に対する抑制効果が挙げられる。

[0007] さて、OAの痛みや炎症の発症メカニズムについては、未だ不明な点が多いが、最近では軟骨の変性によって二次的に引き起こされる滑膜炎との関連性が注目されている。OA滑膜炎は関節水症や熱感など疼痛、炎症症状の主たる原因となるのみならず、タンパク分解酵素、サイトカインやラジカルの産生を介して関節破壊をも促進するため、OAの病態を進展させる主要な増悪因子と考えられている。また、OA滑膜炎は、RAで見られるような著しい増殖性変化はないものの、滑膜細胞の増殖、血管新生と充血、滑膜下の浮腫および線維化など、RA滑膜炎に共通した面も多く認められている。このように、OAの疼痛や炎症をより効率よく除去し、病態の進展を防ぐという見地から、OA滑膜炎の制御は重要である。

[0008] 滑膜に対するHAの作用は未だ十分には解明されていないが、アイソトープを使った実験から、HAは関節腔よりも滑膜に集積し、より長期に存在することが知られている。また、滑膜組織を構成する滑膜細胞の表層には、HAを認識するレセプター[CD44やRHAMM(receptor for HA-mediated motility)]が存在し、滑膜細胞は表層のCD44を介して、分子量200万以上のHAをも細胞内に取り込む機構が備わっていることも報告されている。これらの知見から、HAの疼痛除去作用の少なくとも一部は、滑膜への作用を介して発現している可能性が示唆されているが、しかしながらHA製剤は、OA滑膜炎で引き起こされる炎症症状そのものを抑制するまでの作用はなく、炎症症状の強いOAやRAに対する効果は決して十分ではない。

[0009] 一方、滑膜炎を制御する薬物としては、RAの治療で用いられる修飾性抗リウマチ

薬(以下、DMARDとも称す)と呼ばれる薬物群が良く知られている。中でも特にメトトレキサート(以下、MTXとも称す)は、効力が優れていること、作用発現までの時間が比較的短いこと、などの長所を有する薬剤である。しかし、MTXは全身投与でのみ使用を認められている(現在、日本において、RA治療薬として医薬品の承認を受けているものはカプセル剤のみである。海外では、錠剤と注射剤が承認を受けている。)ため、治療目的部位である関節以外の部位で、その作用メカニズムに起因する重篤な副作用(肝障害、造血障害、肺障害、消化管障害など)を起こすことが知られている。その結果、使用に当たっては十分な副作用のモニタリングと副作用発症時の対策が不可欠である。こうした副作用の懸念の大きさから、MTXをはじめとする滑膜炎抑制薬は、RAに比べ症状の軽いOAなどの他の関節疾患への適応は認められていない。言い換えれば、MTXの全身性の副作用を軽減する手段、もしくは薬効発現に必要な部位でのみMTXの作用を発現できる手段を見出せば、より安全なRA治療法を提供するのみならず、広範囲の関節疾患にMTXを用いることが可能となる。

[0010] MTXの副作用を軽減し、望ましい薬効のみを引き出す手段として、これまでもMTXの作用を関節内や滑膜にのみ限局させるための方法がいくつか試みられている。例えば、MTXを単独で局所投与(関節内投与)する方法が報告されているが、関節内からMTXが速やかに消失してしまうため十分な薬効を発揮できない。また、リポゾーム化したMTXを用いることによって、マクロファージによる貪食能を利用して関節内貯留性を向上させる方法も報告されているが、未だに臨床での有用性は確かめられていない。このように、関節疾患治療薬としてのMTXの副作用を軽減し、期待される薬効のみを引き出すためには、なお技術的な改良が必要である。

[0011] 上述のように、滑膜はHAが集積しやすい組織である。また、滑膜細胞はCD44などのHAレセプターを介してHAを細胞内に取り込む機構を備えている。そのため、HAは薬物を滑膜に集積させるためのキャリアになりうる可能性が考えられる。これまでに、薬物の生体内キャリアとして、HAを利用する技術はいくつか報告されている。しかし、MTXを代表例とする関節疾患治療薬、特に滑膜炎制御に適した薬物のドラッグデリバリーシステム(以下、DDSとも称す)創出に関する技術への応用例はほとん

ど知られていない。

- [0012] これまでの報告例としては、例えば、HAを含む多糖体にペプチド鎖を介して薬物を結合した多糖体-薬物結合体が知られている(特許文献1:特開平5-39306号、特許文献2:国際公開WO94/19376号など)。これらはいずれも癌組織移行性をうたった抗癌剤のDDS技術に関するものである。
- [0013] 特開平5-39306号では、抗癌剤としての目的でMTXが用いられている。しかし、癌組織への移行性と長期体内残留性の無さとを特徴としていることから、抗癌作用を高めるためにMTXの結合率は高く(実施例では6.4-19%)、かつ、HAの分子量は低い(実施例では10万ダルトン)。また、HAのヒドロキシ基にイソウレア結合によりペプチド鎖が結合しているので、水溶液中での安定性は低い。
- [0014] 一方、HAと薬物とを結合させた結合体(コンジュゲート)を関節疾患治療薬に利用した報告例もある。例えば、国際公開WO99/59603号(特許文献3)では、ブチレンアミン基($-C_4H_8NH-$)およびオクチレンアミン基($-C_8H_{16}NH-$)などのスペーサーを介して結合したHAと薬物の結合体が開示されている。当該特許文献において、当該結合体は、細胞外での薬効を想定して、薬物が結合したままの状態での薬効を発現するものとして記載されている。実際、当該結合体ではスペーサーを介しての薬物とHAとの結合が比較的強固なため、MTXのように結合体から遊離しなければ薬効を発揮できない薬物への適応は困難である。
- [0015] それに加え、当該特許文献はマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤(以下、MMP Iとも称す)を薬物として用いた結合体に向けられており、開示されている実施例もMMP Iの結合体に関するもののみである。薬物としてMTXを用いた結合体は何ら具体的に開示されておらず、その医薬としての有用性について何らの記載も含まれていない。
- [0016] 国際公開WO02/44218号(特許文献4)では、13-アミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル基に更に特殊な基(ノルボルネン)を結合させたスペーサーを用い、ノルボルネンとHAのヒドロキシ基とのカルバメート結合の形成により生成したHA-薬物結合体が開示されている。しかし、当該結合体も特許文献2と同様に細胞外での薬効を想定したものと考えられ、薬物が結合したままの状態での薬効を発現する。従って、結

合体から遊離しなければ薬効を発揮できない薬物、例えばMTXへの適応は困難である。さらに、特許文献3は、MMPIを薬物として用いた結合体に向けられており、薬物としてMTXを用いた結合体については何ら示唆されていない。

[0017] 以上述べた通り、上記の文献にはMTXを用いたHA-MTX結合体について何ら記載されておらず、HA-MTX結合体を関節疾患治療薬として使用することに関し何ら記載も示唆もされていない。

[0018] また、先行技術として知られているHA-薬物結合体の合成方法では、合成過程でHAの分子量が大きく低下してしまい、HAの薬効が損なわれてしまうことを本発明者らは確認している。従来のHA-薬物結合体の合成方法では一般的な有機合成反応条件や後処理条件が用いられているが、高分子量のHAと薬物との結合体を調製するには、更なる改良が必要である。

[0019] このように、医薬品として用いるHA-薬物結合体、特に関節疾患治療に適した高分子量のHA-薬物結合体、それを用いた製剤、および当該結合体の合成方法はこれまで知られていなかった。

特許文献1:特開平5-39306号

特許文献2:国際公開WO94/19376号パンフレット

特許文献3:国際公開WO99/59603号パンフレット

特許文献4:国際公開WO02/44218号パンフレット

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0020] 発明が解決しようとする課題は、関節疾患治療薬として有用な、ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を提供することである。

課題を解決するための手段

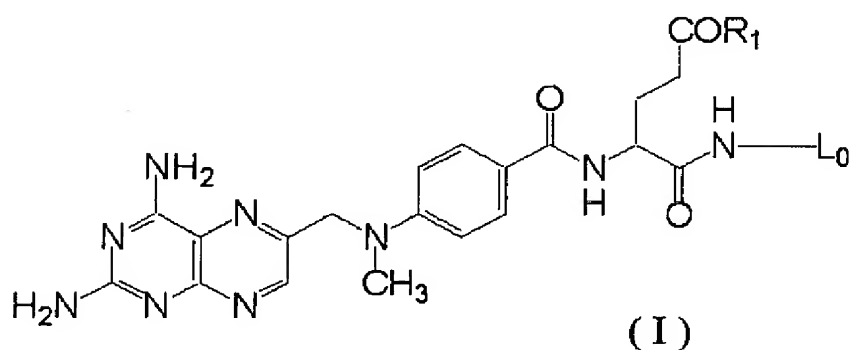
[0021] 本発明者らは、ヒアルロン酸のカルボキシル基に、ペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合した、ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体が、関節疾患治療薬として卓効を有することを見出し、本発明を完成した。

[0022] すなわち本発明の一つの側面により、ヒアルロン酸のカルボキシル基に、1-8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合した、ヒ

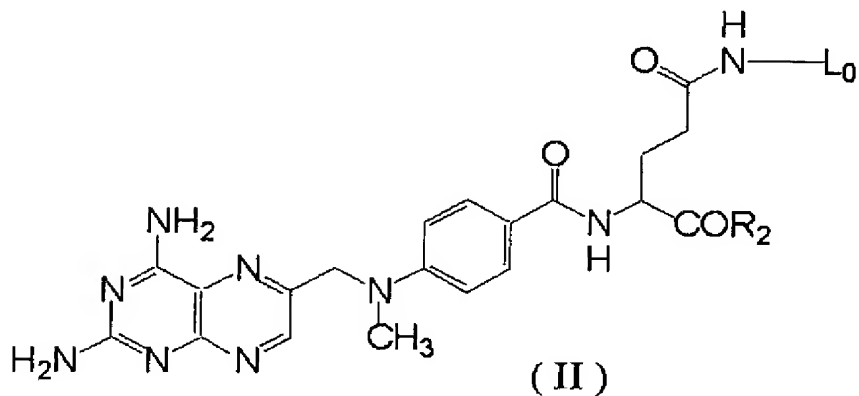
アルロン酸-メトトレキサート結合体が提供される。本発明の1つの実施態様において、当該リンカーは、1〜8個のアミノ酸からなるペプチド鎖、および1〜5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基またはC₁₋₆アルコキシカルボニル基で置換されていてもよいC₂₋₂₀アルキレンジアミン鎖を含むものである。

[0023] 本発明の別の側面により、リンカーに結合したメトトレキサートが、式(I)、(II)、(III)または(IV)：

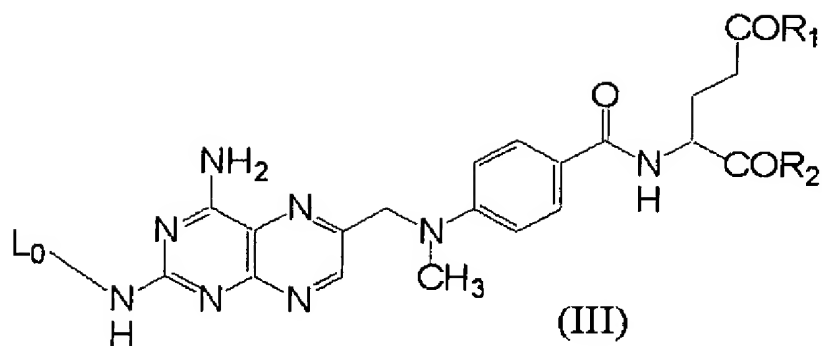
[0024] [化1]



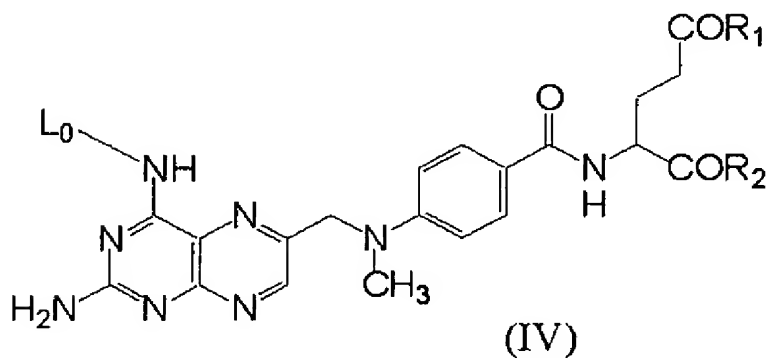
[0025] [化2]



[0026] [化3]



[0027] [化4]



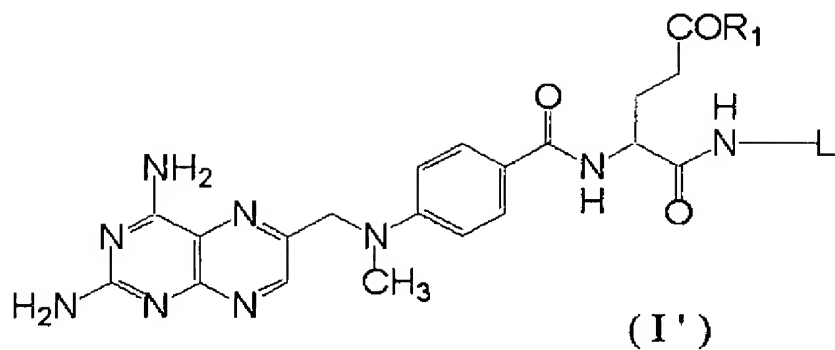
[0028] [式中、 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、またはジ- C_{1-6} アルキルアミノ基であり；

L_0 は、リンカーの結合位置である。]

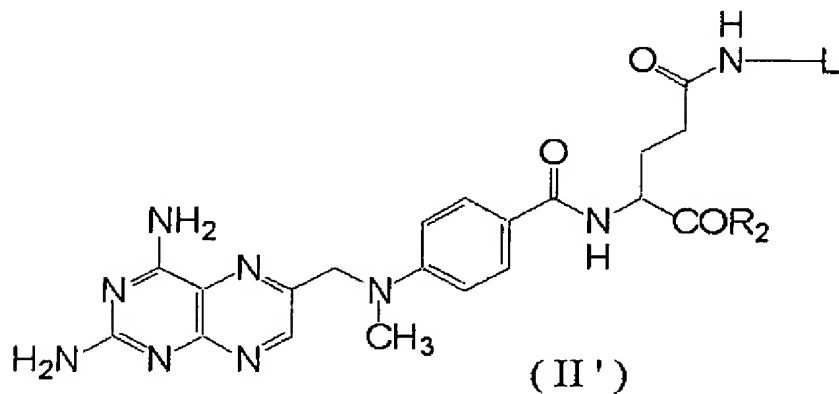
で表される、上記のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体もまた提供される。

[0029] また、本発明の別の側面により、ペプチド鎖を含有するリンカーおよび当該リンカーに結合したメトトレキサートが、式(I')または(II')：

[0030] [化5]

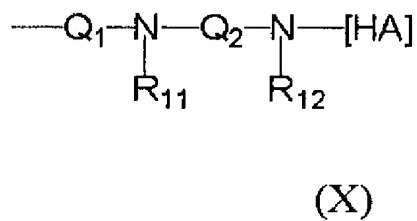


[0031] [化6]



[0032] [式中、 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、またはジ- C_{1-6} アルキルアミノ基であり；
Lは、式(X)

[0033] [化7]



[0034] (式中、 Q_1 は結合する-NH-と一緒に1-8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成し、当該ペプチド鎖に含まれるアミノ酸の各残基は、独立に、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6}

C_{1-6} アルキルカルボニル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基、および C_{6-10} アリールスルホニル基からなる群から選択される、1個以上の基により置換または保護されていてもよく、当該ペプチド鎖に含まれる各アミド結合は、独立に1個以上の C_{1-6} アルキル基および／または C_{1-6} アルキルカルボニル基で窒素原子上を置換されていてもよく、当該残基に含まれる各カルボキシル基は、独立に1または2個の C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

R_{11} および R_{12} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-6} アルキル基であり；

Q_2 は1〜5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基または C_{1-6} アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい C_{2-20} アルキレンであり；および

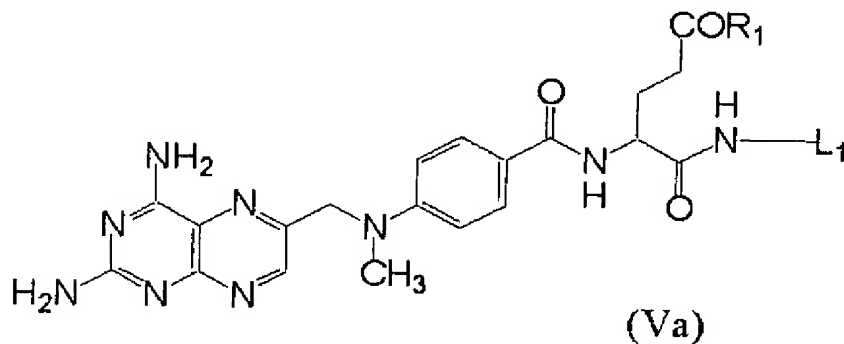
[HA]はヒアルロン酸との結合位置を表し、当該リンカーは当該ヒアルロン酸に含まれるカルボキシル基とアミド結合を形成する。)で表されるリンカーである。]

で表される、上記のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体が提供される。

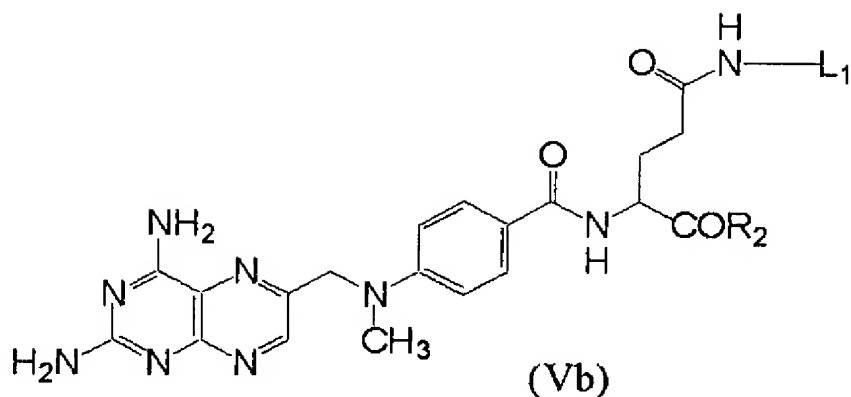
[0035] さらに本発明のその他の側面によれば、上記ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を有効成分として含有する医薬組成物、および関節疾患治療薬もまた提供される。

[0036] さらに本発明の別の側面によれば、上記のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体の製造に利用することができる、式(Va)または(Vb)：

[0037] [化8]

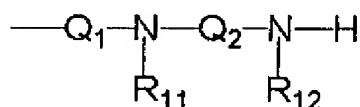


[0038] [化9]



[0039] [式中、 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、またはジ- C_{1-6} アルキルアミノ基であり；
 L_1 は、式 (X')]

[0040] [化10]



(X')

[0041] (式中、 Q_1 は結合する-NH-と一緒に1-8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成し、当該ペプチド鎖に含まれるアミノ酸の各残基は、独立に、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基、および C_{6-10} アリールスルホニル基からなる群から選択される、1個以上の基により置換または保護されていてもよく、当該ペプチド鎖に含まれる各アミド結合は、独立に1個以上の C_{1-6} アルキル基および／または C_{1-6} アルキルカルボニル基で窒素原子上を置換されていてもよく、当該残基に含まれる各カルボキシル基は、独立に1または2個の C_{1-6} アルキルで置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

R_{11} および R_{12} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-6} アルキルであり；

Q_2 は1-5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基ま

たはC₁₋₆ アルコキシカルボニル基で置換されていてもよいC₂₋₂₀ アルキレンである。)である。]

の化合物が提供される。

[0042] さらに本発明の別の側面によれば、上記の式(Va)または(Vb)の化合物をヒアルロン酸と反応させ、当該ヒアルロン酸のカルボキシル基をN-置換アミド基に変換する工程を含む、上記のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体の製造方法もまた提供される。

[0043] 以下本発明の詳細について説明する。

[0044] 本発明のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体(HA-MTX結合体)は新規化合物である。本発明では、ヒアルロン酸(HA)とメトトレキサート(MTX)とを結合させる手段として、HAのカルボキシル基に、ペプチド鎖を含有するリンカーを介してMTXが結合した構造を採用したことにより、HAの疼痛除去作用を保持し、かつ、MTXの滑膜炎軽減作用を併せ持つ。即ち、本発明のHA-MTX結合体は、滑膜に集積した後、滑膜細胞内に取り込まれ、細胞内でMTXの薬効を発現すると考えられる。

[0045] 従って、本発明のHA-MTX結合体をOAもしくはRA患者の膝関節内に投与した場合、従来のHA製剤同様、HAの特性に基づく疼痛除去作用を発現する一方で、滑膜組織に蓄積しながら、徐々に滑膜細胞内に取り込まれ、MTXを解離することにより、滑膜炎抑制作用を持続的に発現する。これにより、経口投与に比べMTXの投与量を大幅に低減することが可能であり、経口投与で問題となる全身性の副作用の懸念を払拭できる。また、投与部位において、HA製剤とMTXの両者は、作用機序の異なる薬理効果を発現し得るので、両者相俟った相乗的な薬効が期待できる。

[0046] 即ち、本発明のHA-MTX結合体により、関節注入剤としてのHAの側面を持ちながら、MTXの滑膜炎抑制作用を投与関節内でのみ安全に発現させることができる、従来にない優れた関節疾患治療薬が提供される。

[0047] 本発明のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体(HA-MTX結合体)は、ヒアルロン酸のカルボキシル基に、ペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合したものである。

[0048] 本発明において「ヒアルロン酸(HA)」とは、特に限定はされないが、例えば平均分

子量5万～1000万ダルトンを有する、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとから成る二糖の重合体である。ヒアルロン酸の塩には、特に限定はされないが、例えばナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、鉄塩、アンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩などが含まれる。ヒアルロン酸及びその塩、並びにそれらの混合物の具体例には、例えば、商品名 スベニール(登録商標:製造販売 中外製薬株式会社);商品名 アルツ(登録商標:製造 生化学工業株式会社、販売 科研製薬株式会社);商品名 オペガン(登録商標:製造 生化学工業株式会社、販売 参天製薬株式会社)などが含まれる。本発明において「ヒアルロン酸誘導体」とは、HAから誘導されるHA骨格を有する物質を意味する。ヒアルロン酸誘導体としては、特に限定はされないが、例えば、HA中の一つ以上のカルボキシル基がエステル化されている物質(例えば、ベンジルエステル化HA(商品名 Hyaff(登録商標)、Fidia Advanced Biopolymers))、HAをホルムアルデヒドで架橋しさらに高分子化した物質(例えば、商品名 Synvisc(登録商標)、Biomatrix))、HA中の一つ以上のヒドロキシ基がアセチル化されているアセチル化HA、などを包含する。

[0049] 本発明のHA-MTX結合体は、HAの疼痛除去作用を損なってはならないため、HA-MTX結合体として、臨床での疼痛除去作用が確認されているHAと同等の分子量サイズと粘弾性を保持したものであることが好ましい。また、分子量が大きくなると粘弾性が上がりハンドリングが困難になること、および生体内におけるキャリアとしてのHAの効果を考慮すると、具体的には、HA-MTX結合体としての分子量が60万～600万ダルトンであることが好ましく、HA-MTX結合体としての分子量が80万～600万ダルトンであることがより好ましく、HA-MTX結合体としての分子量が100万～500万ダルトンであることが特に好ましい。

[0050] ここで、上記した原料HAの分子量、HA-MTX結合体の分子量は、極限粘度から粘度平均分子量を算出する方法で測定したものである。極限粘度($[\eta]$)から粘度平均分子量(Mw)への換算は、以下の式を用いて算出することができる。

$$Mw = ([\eta] / 0.00036)^{1.282}$$

本発明のペプチド鎖を含有するリンカーにおけるペプチド鎖は、アミノ酸により構成される。当該アミノ酸には、グリシン、アラニン、セリン、プロリン、バリン、トレオニン、シ

ステイン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、リジン、グルタミン、グルタミン酸、メチオニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、アルギニン、チロシン、トリプトファンなどの天然 α -アミノ酸の他に、アルキル側鎖を持つ α -アミノ酸(例えば、ノルバリン、ノルロイシン、 t -ロイシンなど)、シクロアルキル基で置換されたアラニンやグリシン(例えば、シクロペンチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシンなど)、またはアリール基で置換されたアラニンやグリシン(例えば、ピリジルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、置換フェニルアラニン、フェニルグリシンなど)などの非天然 α -アミノ酸、 β -アラニンなどの β -アミノ酸、 γ -アミノ酪酸などの γ -アミノ酸、およびタウリンなどのアミノスルホン酸などが含まれる。本発明のリンカーペプチドにおけるアミノ酸には、その残基が適切に置換または保護されたものも含まれる。例えば、当該残基上の官能基は、保護基を用いて保護され得る。この目的のために使用する保護基は当該技術分野で周知であり、その一部の例は、本明細書の他の段落に記載される。各置換基および保護基、特に保護基の導入方法は、当該技術分野において周知のものをを用いればよい。

[0051] 当該リンカーはアミノ酸のみにより構成されていてもよく、またはペプチド鎖の中または末端にアミノ酸以外の化合物に由来する部分を含んでいてもよい。例えば、アルキレンジアミン、オキサアルキレンジアミンのようなジアミノ化合物やコハク酸のようなジカルボン酸化合物がペプチド鎖の中または末端に結合したものなども当該リンカーに含まれる。ペプチド鎖の中または末端にアミノ酸以外の化合物を含む場合で、当該リンカーがMTXのカルボキシル基とヒアルロン酸のカルボキシル基に結合する場合には、アルキレンジアミン、オキサアルキレンジアミンのようなジアミノ化合物がペプチド鎖の末端に存在することが好ましく、エチレンジアミン、4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミンがペプチド鎖の末端に存在することが特に好ましい。また、ペプチド鎖を構成するアミノ酸は特に限定されないが、プロテアーゼに対する親和性の観点から、 α -アミノ酸が好ましく、ペプチド鎖を含有するリンカーのMTXに結合する末端は α -アミノ酸であることが好ましい。

[0052] 当該ペプチド鎖を構成するアミノ酸の数は、特に限定はされないが、典型的には1〜8であり、好ましくは1〜6であり、特に好ましくは1〜4である。当該ペプチド鎖を構

成するアミノ酸の各残基は、独立に1個以上の基により適切に置換または保護され得る。そのような基には、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基(例えば、メキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、(n-またはi-)プロピルオキシカルボニル基、および(n-, s-, またはt-)ブトキシカルボニル基)、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基(例えば、メタンスルホニル基、エタンスルホニル基、および(n-またはi-)プロパンスルホニル基)、 C_{6-10} アリールスルホニル基(例えば、ベンゼンスルホニル基、(o-, m-またはp-)トルエンスルホニル基、および(1-または2-)ナフタレンスルホニル基)が含まれるが、これらに限定されない。置換または保護により、例えば当該残基に含まれるカルボキシル基は C_{1-6} アルコキシカルボニル基に、ヒドロキシ基は C_{1-6} アルコキシ基または C_{1-6} アルキルカルボニルオキシ基に、アミノ基は C_{1-6} アルキルアミノ基、ジ C_{1-6} アルキルアミノ基、 C_{1-6} アルキルカルボニルアミノ基または $N-C_{1-6}$ アルキル- C_{1-6} アルキルカルボニルアミノ基にそれぞれ変換されていてもよい。また、当該残基に含まれるカルボキシル基は、1または2個の C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよい。当該残基中にインドール環やイミダゾール環のような含窒素複素環が含まれる場合は、その環上の窒素原子は、各々独立して、 C_{1-6} アルキル基または C_{1-6} アルキルカルボニル基で保護されていてもよい。当該残基中にグアニジノ基が存在する場合には、そこに含まれている窒素原子も、 C_{1-6} アルキル基または C_{1-6} アルキルカルボニル基で保護され得る。窒素原子に対する他の保護基としては、限定されないが、上記したアルコキシカルボニル基、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基、 C_{6-10} アリールスルホニル基のような通常用いられるものを選択することもできる。チオール基が当該残基に含まれる場合は、 C_{1-6} アルキル基または C_{1-6} アルキルカルボニル基で保護され得る。また、当該ペプチド鎖に含まれるアミド結合も、 C_{1-6} アルキル基および/または C_{1-6} アルキルカルボニル基で置換されていてもよく、例えば $-CON(C_{1-6} \text{ アルキル})-$ に変換されていてもよい。

[0053] ペプチド鎖を構成するアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、以下のようなものが挙げられる。尚、ターゲットとなる生体内プロテアーゼが存在し、その基質認識アミノ酸配列が既知の場合、その認識部位および/または切断部位を含むアミノ酸配列を用いてもよい。

- [0054] アミノ酸1個からなるペプチド鎖:Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、など。好ましくは、Phe、Tyr、Ile、Glu。
- [0055] アミノ酸2個からなるペプチド鎖:PhePhe、PheGly、PheLeu、TyrPhe、TrpPhe、PheTrp、PheTyr、GlyPhe、GlyGly、など。好ましくは、PhePhe、PheGly。
- [0056] アミノ酸3個からなるペプチド鎖:PheGlyGly、PheLeuGly、PhePheGly、AsnPhePhe、GlyPhePhe、LeuPhePhe、LeuAlaLeu、AlaValAla、GlyAlaPhe、GlyPheAla、GlyIleAla、GlyIlePhe、GlyLeuAla、GlyValAla、GlyValPhe、GlyGlyGly、など。好ましくは、AsnPhePhe。
- [0057] アミノ酸4個からなるペプチド鎖:GlyPheLeuGly、GlyPhePheLeu、GlyPhePheAla、GlyPheTyrAla、GlyPheGlyPhe、GlyPheGlyGly、GlyGlyPheGly、GlyGlyPheTyr、GlyGlyGlyGly、LeuAlaLeuAla、AlaLeuAlaLeu、AlaGlyValPhe、GluAsnPhePhe、など。好ましくは、GlyPheLeuGly。
- [0058] 本発明におけるリンカーは、例えば上記式(X)で示される構造を有していてもよく、その場合 Q_1 は結合する-NH-と一緒にあって上述したような1〜8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成する。また、 Q_2 は1〜5個の酸素原子が挿入されるか、もしくはカルボキシル基または C_{1-6} アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい C_{2-20} アルキレンである。 Q_2 の具体例としては、エタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、ノナン-1, 9-ジイル基、デカン-1, 10-ジイル基、2-メチルプロパン-1, 3-ジイル基、2-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-エチルペンタン-1, 5-ジイル基、2-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、3-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1, 7-ジイル基、3-オキサペンタン-1, 5-ジイル基、3-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、4-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、3-オキサヘプタン-1, 7-ジイル基、4-オキサヘプタン-1, 7-ジイル基、4-オキサオクタン-1, 8-ジイル基、3, 6-ジオキサオクタン-1, 8-ジイル基、3, 6-ジオキサノナン-1, 9-ジイル基、3, 6-ジオキサ-4-メチルノナン-1, 9-ジイル基、4, 7-ジオ

キサデカン-1, 10-ジイル基、4, 9-ジオキサドデカン-1, 12-ジイル基、4, 7, 10-トリオキサトリデカン-1, 13-ジイル基などが挙げられ、好ましくは、エタン-1, 2-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、3-オキサペンタン-1, 5-ジイル基、3, 6-ジオキサオクタン-1, 8-ジイル基、4, 7-ジオキサデカン-1, 10-ジイル基、4, 9-ジオキサドデカン-1, 12-ジイル基、4, 7, 10-トリオキサトリデカン-1, 13-ジイル基などが挙げられる。

[0059] 本発明のHA-MTX結合体は、HAのカルボキシル基に、ペプチド鎖を含有するリンカーを介してMTXが結合するものであればどのような結合様式をとっていてもよい。即ち、ペプチド鎖を含有するリンカーは、

- 1) MTXの α 位のカルボキシル基；
- 2) MTXの γ 位のカルボキシル基；および
- 3) MTXのアミノ基と結合しうるものであり、さらにこれらの結合様式が複数混在(例えば、MTXの α 位のカルボキシル基で結合した結合体と、MTXの γ 位のカルボキシル基で結合した結合体が混在)していてもよい。しかしながら、プロテアーゼに対する親和性と合成上の観点から、ペプチド鎖を含有するリンカーはMTXの α 位のカルボキシル基及び／または γ 位のカルボキシル基と結合していることが好ましく、当該リンカーはMTXの α 位のカルボキシル基と結合していることがより好ましい。

[0060] 本発明のHA-MTX結合体において、ペプチド鎖を含有するリンカーおよびその結合様式のうち特に好ましいものは、ペプチド鎖を含有するリンカーが α -アミノ酸からなるペプチド鎖の末端にジアミノ化合物が存在するものであり、そのペプチド鎖のN末端がMTXの α 位のカルボキシル基に酸アミド結合によって結合し、そのペプチド鎖のC末端がジアミノ化合物を介してHAのカルボキシル基と酸アミド結合によって結合しているものである。

[0061] 本発明のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体におけるメトトレキサート(MTX)部分は、リンカーによる修飾以外に、公知の方法によりプロドラッグ化されていてもよい。

[0062] 本明細書においてC₁₋₆アルキル基は、炭素数1〜6の直鎖または分枝鎖状のアルキル基を意味し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、i-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、3-メチルブチル

基、2-メチルブチル基、1-メチルブチル基、1-エチルプロピル基、及びn-ヘキシル基等を含む。

- [0063] 本明細書においてC₁₋₆ アルキルカルボニルは、炭素数1-6の直鎖または分枝鎖状のアルキルカルボニル基を意味し、例えば、アセチル基、プロピオニル基、2-メチルプロピオニル基、2, 2-ジメチルプロピオニル基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。
- [0064] 本明細書においてC₁₋₆ アルコキシは、炭素数1-6の直鎖または分枝鎖状のアルコキシ基を意味し、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。
- [0065] 本明細書においてC₁₋₆ アルキルアミノは、炭素数1-6の直鎖または分枝鎖状のアルキルアミノ基を意味し、例えばメチルアミノ基、エチルアミノ基、n-プロピルアミノ基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。
- [0066] 本明細書においてジC₁₋₆ アルキルアミノは、炭素数1-6の直鎖または分枝鎖状のジアルキルアミノ基を意味し、例えばジメチルアミノ基、エチルメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、エチルn-プロピルアミノ基などの、同一または異なってもよい既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。
- [0067] 本明細書においてジC₂₋₂₀ アルキレンは、炭素数2-20の直鎖または分枝鎖状のアルキレン基を意味し、例えばエチレン基、プロピレン基、ブチレン基、オクチレン基、デカレン基などが含まれる。
- [0068] 本明細書においてC₁₋₆ アルコキシカルボニル基は、炭素数1-6の直鎖または分枝鎖状のアルコキシカルボニル基を意味し、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、n-プロポキシカルボニル基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。
- [0069] 本明細書においてC₁₋₆ アルキルスルホニル基は、炭素数1-6の直鎖または分枝鎖状のアルキルスルホニル基を意味し、例えばメタンスルホニル基、エタンスルホニル基、n-プロパンスルホニル基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。
- [0070] 本明細書におけるアシル化には、C₁₋₆ アルキルカルボニル化;およびベンゾイル化

などが含まれ、当該ベンゾイル基はC₁₋₆ アルキル、ハロゲン原子、C₁₋₆ アルコキシなどで置換されていてもよい。

[0071] 本発明のHA-MTX結合体におけるMTXの結合率は、薬効を発揮し副作用の懸念が無い範囲であることが好ましい。本明細書におけるMTXの結合率は、以下の式：

[0072] [化11]

$$(\text{MTXの結合率}(\%)) = \frac{(\text{分子中に結合するMTX部分の数})}{(\text{分子中のグルクロン酸部分の数})} \times 100$$

[0073] により算出される。MTXの結合率は、特に限定はされないが、薬効発現の観点から0.5%以上が好ましく、1.0%以上がより好ましい。一方で、MTXの作用を投与部分に局限させ、MTXの有する全身性の副作用を低減するためには、結合率は10%より小さいことが好ましい。また、本発明のHA-MTX結合体は、分子量が大きく、かつ、MTXの結合率が高いと不溶化を起こし合成上の不都合が生じることを考慮すると、MTXの結合率は0.5%以上かつ4.5%より小さいことが好ましく、1.0%以上かつ4.5%より小さいことが特に好ましい。

[0074] 本発明のHA-MTX結合体は、塩として存在することもできるが、その用途を考慮すれば薬学上許容可能な塩であることが好ましい。例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、鉄塩、アンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩などが挙げられる。

[0075] 本発明のHA-MTX結合体の合成にあたっては、HA、ペプチド鎖を含有するリンカー、MTXを適当な順番で結合させることによって得ることができる。例えば、HA-ペプチド鎖を含有するリンカーを構築した後にMTXを導入するルートや、MTX-ペプチド鎖を含有するリンカーを構築した後HAを導入するルートが挙げられる。この各結合反応は、通常のアミド結合反応に用いられる溶媒と縮合剤と必要に応じて反応促進性の添加剤を用いて、-20℃～40℃の温度で、数分～数日間反応させることで行える。溶媒としては、例えば、水、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、メタノール、エタノー

ル、ジクロロメタン、クロロホルムなど、および、それらの混液が挙げられる。縮合剤としては、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミドなどのカルボジイミド化合物や、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス(ジメチルアミノ)ホスフォニウムヘキサフルオロホスフェート、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリンなどが挙げられる。反応促進性の添加剤としては、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-カルボキシイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール、3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアゾール、などの活性エステル剤や、トリエチルアミン、N-メチルモルホリン、N, N-ジイソプロピルエチルアミン、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミンなどのpH調整剤が挙げられる。反応の際、アミノ酸側鎖等の官能基、例えばヒドロキシ基、カルボキシル基、アミノ基等は、必要に応じて通常の有機合成において汎用される保護基を用いることができる。

[0076] ここで、HA分子量の低下を防ぐために、コンジュゲート化反応の制御のしやすさの観点からMTX-ペプチド鎖を含有するリンカーを構築した後HAに導入するルートが好ましい。溶媒は水、N, N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、エタノール、および、それらの混液が好ましく、水とテトラヒドロフランの混液が最も好ましく、その混合比率は1:1が最も好ましい。縮合剤は水溶性のものが好ましく、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドが最も好ましく、その添加量はHA中のカルボキシル基に対して0.1当量が最も好ましい。反応促進性添加剤は、活性エステル剤としては3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアゾールが最も好ましく、その添加量はHA中のカルボキシル基に対して0.1当量が最も好ましい。pH調整剤としてはトリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミンが最も好ましく、反応時pHが6-7であることが最も好ましい。また、反応温度は、-10℃-30℃が好ましく、0℃-15℃が最も好ましい。反応時間は、1時間-48時間が好ましく、12時間-24時間が最も好ましい。

[0077] 本発明において「関節疾患」とは、具体的には、関節軟骨欠損、変形性関節症(明

らかな原因のない1次性と原因疾患が認められる2次性を含む)、肩関節周囲炎、関節リウマチ、反応性関節炎、ウイルス性関節炎、化膿性関節炎、結核性関節炎、神経性関節症などの疾患を指し、さらに、これら疾患における関節痛(例えば、関節リウマチにおける膝関節痛など)をも包含する。また、「関節疾患治療薬」とは、前記関節疾患の治療に用いられる薬剤だけでなく、予防に用いられる薬剤、病態の進展抑制(悪化の防止や現状維持)等のために用いられる薬剤をも包含する。

[0078] 本発明のHA-MTX結合体は、その有効量に、適宜、製薬上許容しうる担体、賦型剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、香料、着色剤等を加えて医薬組成物として用いることができる。本発明のHA-MTX結合体を有効成分とする医薬組成物は、関節疾患治療薬として用いられることが好ましく、その中でも関節局所投与製剤として用いられることが特に好ましい。

[0079] 本発明のHA-MTX結合体を関節疾患治療薬として製剤化するに際しては、特に限定されないが、例えば、生理食塩水やリン酸生理食塩水等に所望の濃度に溶解させ、注射用製剤として製剤化することができる。この際、必要に応じて、酸又は塩基を加えることにより、溶液を所望のpHに調整してもよい。また、ナトリウム塩、カリウム塩等の1価の金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩等の2価の金属塩等の無機塩等を加えることにより、溶液を所望の塩濃度に調整してもよい。更に、所望に応じて、安定化剤等が加えられていてもよい。このようにして調製された、本発明のHA-MTX結合体を溶解させた溶液を、ディスポーザブル注射筒等の注射器に予め充填させた形で流通させてもよい。本発明のHA-MTX結合体を有効成分とする関節疾患治療薬として投与するに際しては、本発明のHA-MTX結合体が0.01%~10%w/vの溶液濃度、好ましくは0.1%~2.0%w/vの溶液濃度、特に好ましくは0.5%~1.5%w/vの溶液濃度のものを、1回あたり1~3mLを患者に投与すればよい。但し、この投与量は、医師の指示、対象となる患者、又は疾患の種類やその重篤度、或いはHA-MTX結合体の分子量等により、それぞれ最適な投与量に適宜増減してもよい。

[0080] 本発明のHA-MTX結合体は、以下の実施例において説明するとおり、膝関節に病態が発症する関節炎モデルに関節内投与すると、HAには見られない滑膜炎の軽

減作用を発現する。さらに本願発明者らは、この滑膜炎の軽減作用は、低分子量(分子量30万ダルトン)のHA-MTX結合体と比して、60万ダルトン以上、特に分子量80万ダルトン以上のHA-MTX結合体に極めて高い効果が確認されることを見出した。

図面の簡単な説明

[0081] [図1]図1は、各被検物質および対照(分子量190万のヒアルロン酸および分子量80万のヒアルロン酸)の、粘弾性を測定した結果を示す。

[図2]図2は、各被検物質投与群および対照群(HAおよびvehicle)における、mBSAを膝関節内に投与直後からの膝関節腫脹の経時的推移を示す。

[図3]図3は、図2の各被検物質投与群および対照群のグラフについてのAUCを示す。

[図4]図4は、実施例1投与群および対照群(HAおよびSaline)における、コラーゲン関節炎を誘導した直後からの膝関節幅の経時的推移を示す。左図は投与部位の右膝関節の経時的推移を示し、右図は非投与部位の左膝関節の経時的推移を示す。グラフは平均±標準誤差で示す。

[図5]図5は、実施例1投与群および対照群(HAおよびSaline)における、コラゲナーゼOAモデルの関節炎を、誘導直後から20日後までの膝関節腫脹の経時的推移として示す。グラフは平均±標準誤差で示す。

[図6]図6は、実施例2-2投与群および生理食塩水群における、コラゲナーゼOAモデルの下腿骨内顆部の軟骨変性の程度を示す。グラフは平均±標準誤差で示す。

発明を実施するための最良の形態

[0082] 本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0083] [実施例1-1]

2-[N-[N-[N-[4-[(2, 4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]メチルアミノ]ベンゾイル]- α -(O5-メチルグルタミル)]フェニルアラニル]フェニルアラニルアミノ]エチルアミン:MTX- α -PhePhe-NH-C₂H₄-NH₂ (化合物1)の製造

(a) Cbz-Phe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物1a) の製造

N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニン (Cbz-Phe: 7.16g、25.4mmol) と N-tert-ブトキシカルボニル-エチレンジアミン塩酸塩 (5.00g、25.4mmol) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBT: 4.28g、28.0mmol) と N-メチルモルホリン (NMM: 3.07mL、28.0mmol) をジメチルホルムアミド (DMF) 100mL に溶解し、氷冷撹拌下 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC: 5.36g、28.0mmol) を加え、室温で1日間撹拌した。反応液に10%クエン酸水溶液を加え、析出した固体をクロロホルムと少量のメタノールに溶かし、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 クロロホルム:メタノール=95:5)で精製し、白色固体の標題化合物9.69gを得た。

- [0084] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1.37 (9H, s)、2.69–3.19 (6H, m)、4.12–4.22 (1H, m)、4.93 (2H, dd, J=12.9Hz, J=15.1Hz)、6.75 (1H, br. t)、7.22–7.33 (10H, m)、7.48 (1H, d, J=8.6Hz)、8.05 (1H, br. t)
LC/MS: 441.9 (M+H⁺) 464.1 (M+Na⁺)

(b) Cbz-PhePhe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物1b) の製造

化合物1a (9.69g、21.9mmol) をメタノール200mL に溶解し、10%パラジウム炭素500mgを加え、水素雰囲気下室温で1日撹拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣と Cbz-Phe (6.92g、23.1mmol) と HOBT (3.71g、24.2mmol) と NMM (2.66mL、24.2mmol) をジメチルホルムアミド (DMF) 50mL に溶解し、氷冷撹拌下 EDC (4.64g、24.2mmol) を加え、室温で1日間撹拌した。反応液に水を加え、10%クエン酸水溶液、飽和重曹水、水で洗浄し乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 クロロホルム:メタノール=90:10)で精製し、白色固体の標題化合物12.8gを得た。

- [0085] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1.37 (9H, s)、2.62–3.18 (8H, m)、4.18–4.29 (1H, m)、4.40–4.51 (1H, m)、4.93 (2H, s)、6.72 (1H, br. t)、7.10–7.32 (15H, m)、7.46 (1H, d, J=8.6Hz)、7.97 (1H, br. t)、8.11 (1H, d, J=7.9Hz)

LC/MS: 588. 8 ($M+H^+$) 611. 1 ($M+Na^+$)

(c) Cbz-Glu(OMe)PhePhe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物1c)の製造

化合物1b(11. 1g、18. 9mg)をメタノール800mLとDMF50mLとTHF500mLに溶解し、10%パラジウム炭素1. 00gを加え、水素雰囲気下室温で1日攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣とN-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-γ-メチルエステル(Cbz-Glu(OMe): 5. 58g、18. 9mmol)とHOB T(3. 18g、20. 8mmol)とNMM(2. 29mL、20. 8mmol)をDMF100mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC(3. 99g、20. 8mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。氷冷攪拌下反応液に10%クエン酸を加え生じた沈殿を、5%重曹水、水で洗浄後、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)で精製し、メタノールを加え沈殿を生じさせ白色粉末の標題化合物11. 1gを得た。

[0086] ¹H-NMR(270MHz、DMSO-d₆): δ 1. 36(9H, s)、1. 64-1. 80(2H, m)、2. 17-2. 23(2H, m)、2. 76-3. 12(8H, m)、3. 56(3H, s)、3. 93-4. 03(1H, m)、4. 40-4. 58(2H, m)、5. 00(2H, s)、6. 68(1H, br. t)、7. 18-7. 44(16H, m)、7. 84-7. 90(2H, m)、8. 19(1H, d, J=7. 7Hz)

LC/MS: 732. 4 ($M+H^+$)、754. 4 ($M+Na^+$)

(d) MTX-α-PhePhe-NH-C₂H₄-NH-Boc (化合物1d)の製造

化合物1c(348mg、0. 476mmol)をメタノール10mLとテトラヒドロフラン10mLに懸濁し、10%パラジウム炭素33mgを加え、水素雰囲気下室温で1. 5時間攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣と4-[N-(2, 4-ジアミノ-6-プテリジニルメチル)-N-メチルアミノ]安息香酸: 197mg、0. 547mmol)とHOB T(76mg、0. 499mmol)をN-メチルピロリドン(NMP)4mLに溶解し、氷冷攪拌下N-メチルモルホリン(NMM、55 μL、0. 499mmol)とEDC(105mg、0. 547mmol)を加え、室温で4日間攪拌した。反応液に5%重曹水を加え生じた沈殿をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)、続いて、アミンシリカゲル(NH-DM1020、100-200mesh、富士シリシア化学株式会社製)カラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)で精製し、黄色粉末の標題化合物362mgを得た。

[0087] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.35 (9H, s)、1.78–1.94 (2H, m)、2.23 (2H, m)、2.69–3.10 (8H, m)、3.22 (3H, s)、3.55 (3H, s)、4.27–4.52 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.63 (2H, br. s)、6.70 (1H, br. t)、6.82 (2H, d, $J=8.9\text{Hz}$)、7.06–7.25 (10H, m)、7.46 (1H, br. s)、7.66–7.88 (5H, m)、8.06–8.17 (2H, m)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 905.5 ($\text{M}+\text{H}^+$)

(e) $\text{MTX}-\alpha\text{-PhePhe-NH-C}_2\text{H}_4\text{-NH}_2$ (化合物1)の製造

化合物1d (360mg, 0.398mmol)に、氷冷下、トリフルオロ酢酸5mLを加え1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=100:10、2回)で精製し、黄色粉末の標題化合物275mgを得た。

[0088] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.80–1.96 (2H, m)、2.20–2.28 (2H, m)、2.45 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$)、2.70–3.10 (6H, m)、3.22 (3H, s)、3.55 (3H, s)、4.26–4.52 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.61 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)、7.06–7.21 (10H, m)、7.46 (1H, br. s)、7.65–7.73 (3H, m)、7.85 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$)、8.08–8.16 (2H, m)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 805.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1-2]

4, 7, 10-トリオキサ-13-[N-[N-[N-[4-[(2, 4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]メチルアミノ]ベンゾイル]- α -(O5-メチルグルタミル)]フェニルアラニル]フェニルアラニルアミノ]トリデカニルアミン: $\text{MTX}-\alpha\text{-PhePhe-NH-C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{-NH}_2$ (化合物2)の製造

(a) $\text{Cbz-Phe-NH-C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{-NH-Boc}$ (化合物2a)の製造

N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニン (Cbz-Phe: 852mg, 2.85mmol)とN-tert-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミン (760mg, 2.37mmol)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBT: 363mg, 2.37mmol)をジメチルホルムアミド (DMF) 6mLに溶解し、氷冷攪拌下1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC: 546mg, 2.85mmol)を加え、室

温で2日間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10%クエン酸水溶液、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=100:3)で精製し、油状の標題化合物1.35gを得た。

[0089] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3): δ 1.43 (9H, s)、1.56–1.74 (4H, m)、3.06 (2H, d, $J=6.8\text{Hz}$)、3.17–3.58 (16H, m)、4.30–4.39 (1H, m)、4.98 (1H, br)、5.08 (2H, s)、5.50 (1H, br)、6.40 (1H, br)、7.16–7.32 (10H, m)

LC/MS: 624.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

(b) $\text{Cbz-PhePhe-NH-C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{-NH-Boc}$ (化合物2b) の製造

化合物2a (1.35g, 2.24mmol) をメタノール12mLに溶解し、10%パラジウム炭素200mgを加え、水素雰囲気下室温で4時間攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣とCbz-Phe (1.07g, 3.57mmol) とHOBT (514mg, 3.36mmol) をDMF10mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC (688mg, 3.59mmol) を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10%クエン酸水溶液、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=100:3)で精製した。n-ヘキサンを加えると白色沈殿物を生じ、ろ取して標題化合物1.56gを得た。

[0090] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3): δ 1.43 (9H, s)、1.60–1.78 (4H, m)、2.96–3.60 (20H, m)、4.42–4.59 (2H, m)、4.96–5.07 (3H, m)、5.41 (1H, br. d)、6.39 (1H, br)、6.73 (1H, br. d)、7.08–7.31 (15H, m)

LC/MS: 771.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

(c) $\text{Cbz-Glu(OMe)PhePhe-NH-C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{-NH-Boc}$ (化合物2c) の製造

化合物2b (500mg, 0.668mmol) をメタノール10mLに溶解し、10%パラジウム炭素150mgを加え、水素雰囲気下室温で1日攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣とN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステル (Cbz-Glu(OMe): 217mg, 0.734mmol) とHOBT (102mg, 0.668mmol) をDMF10mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC (688mg, 3.59mmol) を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10%クエン酸水溶液、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=100:3)で精製した。n-ヘキサンを加えると白色沈殿物を生じ、ろ取して標題化合物1.56gを得た。

ol)をDMF 5mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC (141mg, 0.734mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10%クエン酸水溶液、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=100:5)で精製した。n-ヘキサンを加えると白色沈殿物を生じ、ろ取して標題化合物529mgを得た。

[0091] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.36 (9H, s)、1.50–1.85 (6H, m)、2.20 (2H, t, $J=7.9\text{Hz}$)、2.70–3.10 (8H, m)、3.25–3.48 (12H, m)、3.56 (3H, s)、3.93–4.02 (1H, m)、4.20–4.60 (2H, m)、5.00 (2H, s)、6.77 (1H, br. t)、7.10–7.45 (16H, m)、7.82 (1H, br. t, $J=6.1\text{Hz}$)、7.91 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$)、8.22 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$)

LC/MS: 914.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

(d) $\text{MTX}-\alpha\text{-PhePhe-NH-C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{-NH-Boc}$ (化合物2d)の製造

化合物2c (514mg, 0.576mmol)をメタノール30mLに懸濁し、10%パラジウム炭素100mgを加え、水素雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣と4-[N-(2,4-ジアミノ-6-プテリジニルメチル)-N-メチルアミノ]安息香酸:281mg, 0.864mmol)とHOBT (132mg, 0.864mmol)をDMF 5mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC (166mg, 0.864mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に5%重曹水を加え生じた沈殿をアミンシリカゲル (NH-DM1020 , 100–200mesh、富士シリシア化学株式会社製)カラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 1回目、ジクロロメタン:メタノール=100:7、2回目、クロロホルム:メタノール=100:4)で精製し、黄色粉末の標題化合物415mgを得た。

[0092] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.36 (9H, s)、1.48–1.61 (4H, m)、1.81–1.92 (2H, m)、2.24 (2H, t, $J=7.9\text{Hz}$)、2.70–3.10 (8H, m)、3.22 (3H, s)、3.25–3.47 (12H, m)、3.54 (3H, s)、4.25–4.50 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.61 (2H, br. s)、6.76–6.83 (3H, m)、7.06–7.24 (10H, m)、7.45 (1H, br. s)、7.67–7.80 (4H, m)、7.86 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$)、8.09 (1H, d, $J=7.4\text{Hz}$)、8.15 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$)、8.56 (1H, s)

LC/MS:1087.5(M+Na⁺)

(e) MTX- α -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物2)の製造

化合物2d(413mg、0.388mmol)に、氷冷下、トリフルオロ酢酸3mLを加え40分間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=100:7、2回)で精製し、黄色粉末の標題化合物344mgを得た。

[0093] ¹H-NMR(270MHz、DMSO-d₆): δ 1.49-1.95(4H、m)、1.81-1.92(2H、m)、2.24(2H、t、J=7.9Hz)、2.70-3.10(8H、m)、3.22(3H、s)、3.25-3.47(12H、m)、3.54(3H、s)、4.25-4.50(3H、m)、4.79(2H、s)、6.61(2H、br. s)、6.76-6.83(3H、m)、7.06-7.24(10H、m)、7.45(1H、br. s)、7.83(1H、br. t、J=5.8Hz)、8.01(1H、d、J=7.9Hz)、8.09(1H、d、J=7.1Hz)、8.15(1H、d、J=7.8Hz)、8.56(1H、s)

LC/MS:965.5(M+H⁺)

[実施例1-3]

MTX- α -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₂-NH₂ (化合物3)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N- ϵ -ブトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- ϵ -ブトキシカルボニル-4,9-ジオキサ-1,12-ドデカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物221mgを得た。

[0094] ¹H-NMR(400MHz、DMSO-d₆): δ 1.47-1.60(8H、m)、1.80-1.95(2H、m)、2.20-2.29(2H、m)、2.60(2H、t)、2.70-3.10(6H、m)、3.22(3H、s)、3.25-3.50(8H、m)、3.54(3H、s)、4.25-4.49(3H、m)、4.79(2H、s)、6.60(2H、br. s)、6.81(2H、d、J=8.4Hz)、7.06-7.20(10H、m)、7.45(1H、br. s)、7.65(1H、br. s)、7.70(2H、d)、7.73(1H、br. t)、7.83(1H、d)、8.10(1H、d)、8.11(1H、d)、8.55(1H、s)

LC/MS:949.5(M+H⁺)

[実施例1-4]

MTX- α -PhePhe-NH-C₈H₁₆O₂-NH₂ (化合物4)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7-ジオキサ-1, 10-デカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物407mgを得た。

- [0095] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6): δ 1.50–1.57 (4H, m)、1.85–1.91 (2H, m)、2.21–2.28 (2H, m)、2.60 (2H, t)、2.70–3.13 (6H, m)、3.22 (3H, s)、3.25–3.45 (8H, m)、3.55 (3H, s)、4.27–4.49 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$)、7.07–7.21 (10H, m)、7.43 (1H, br. s)、7.69 (1H, br. s)、7.71 (2H, d, $J=8.8\text{Hz}$)、7.75 (1H, br. t)、7.85 (1H, d)、8.08 (1H, d)、8.13 (1H, d)、8.56 (1H, s)
LC/MS: 921.4 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1-5]

MTX- α -PhePhe-NH-C₆H₁₂O₂-NH₂ (化合物5)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-*t*-ブトキシカルボニル-3, 6-ジオキサ-1, 8-オクタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物148mgを得た。

- [0096] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.81–1.91 (2H, m)、2.20–2.25 (2H, m)、2.61–2.64 (2H, t)、2.70–2.97 (6H, m)、3.22 (3H, s)、3.27–3.47 (8H, m)、3.55 (3H, s)、4.27–4.47 (3H, m)、4.79 (2H, s)、6.62 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)、7.06–7.25 (10H, m)、7.46 (1H, br. s)、7.67 (1H, br. s)、7.71 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7.85 (1H, d)、7.92 (1H, br. t)、8.07 (1H, d)、8.15 (1H, d)、8.56 (1H, s)
LC/MS: 893.6 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1-6]

MTX- α -PhePhe-NH-C₄H₈O-NH₂ (化合物6)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-*t*-ブトキシカルボニル-3-オキサ-1, 5-ペンタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物52mgを得た。

- [0097] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.84–1.92 (2H, m)、2.20–2.27 (2

H、m)、2. 60–2. 64(2H、t)、2. 71–2. 99(6H、m)、3. 22(3H、s)、3. 25–3. 45(4H、m)、3. 54(3H、s)、4. 27–4. 50(3H、m)、4. 79(2H、s)、6. 61(2H、br. s)、6. 81(2H、d、J=8. 4Hz)、7. 05–7. 21(10H、m)、7. 45(1H、br. s)、7. 65(1H、br. s)、7. 70(2H、d、J=8. 6Hz)、7. 84(1H、d)、7. 91(1H、br. t)、8. 07(1H、d)、8. 15(1H、d)、8. 55(1H、s)

LC/MS:849. 4(M+H⁺)

[実施例1-7]

MTX- α -PhePhe-NH-C₅H₁₀-NH₂(化合物7)の製造

実施例1-1と同様の方法で、N- ϵ -ブトキシカルボニル-1, 2-エチレンジアミンの代わりにN- ϵ -ブトキシカルボニル-1, 5-ペンタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物148mgを得た。

[0098] ¹H-NMR(270MHz、DMSO-d₆): δ 1. 16–1. 56(6H、m)、1. 81–1. 97(2H、m)、2. 21–2. 29(2H、m)、2. 69–3. 06(6H、m)、3. 23(3H、s)、3. 55(3H、s)、4. 25–4. 50(3H、m)、4. 80(2H、s)、6. 65(2H、br. s)、6. 82(2H、d、J=8. 6Hz)、7. 08–7. 24(10H、m)、7. 50(1H、br. s)、7. 60–7. 89(5H、m)、8. 10–8. 16(2H、m)、8. 55(1H、s)

LC/MS:847. 4(M+H⁺)

[実施例1-8]

MTX- α -PhePhe-Lys-OMe(化合物8)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N- ϵ -ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN- ϵ - ϵ -ブトキシカルボニル-L-リジンメチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物178mgを得た。

[0099] ¹H-NMR(270MHz、DMSO-d₆): δ 1. 25–1. 34(4H、m)、1. 56–1. 69(2H、m)、1. 75–1. 90(2H、m)、2. 18–2. 25(2H、br. t)、2. 50–2. 60(2H、m)、2. 65–3. 07(4H、m)、3. 22(3H、s)、3. 54(3H、s)、3. 60(3H、s)、4. 15–4. 60(4H、m)、4. 79(2H、s)、6. 63(2H、br. s)、6. 81(2H、d、J=8. 7Hz)、7. 00–7. 25(10H、m)、7. 45(1H、br. s)、7. 62(1H、br. s)、7. 69(2H、d、J=8. 6Hz)、7. 80(1H、d)、8. 05(1H、d)

), 8. 16(1H, d)、8. 30(1H, d)、8. 56(1H, s)

LC/MS: 905. 4(M+H⁺)

[実施例1-9]

MTX- α -PheGly-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物9)の製造

実施例1-2(a)の工程のN-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシグリシンを用いた以外は、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物528mgを得た。

[0100] ¹H-NMR(270MHz、DMSO-d₆): δ 1. 51-1. 64(4H, m)、1. 84-1. 94(2H, m)、2. 21-2. 30(2H, m)、2. 55(2H, t, J=6. 3Hz)、2. 78-2. 92(1H, m)、3. 03-3. 76(17H, m)、3. 22(3H, s)、3. 55(3H, s)、4. 26-4. 52(2H, m)、4. 79(2H, s)、6. 63(2H, br. s)、6. 82(2H, d, J=8. 7Hz)、7. 11-7. 24(5H, m)、7. 47(1H, br. s)、7. 62-7. 72(4H, m)、8. 04-8. 16(2H, m)、8. 28(1H, br. t)、8. 56(1H, s)

LC/MS: 875. 5(M+H⁺)

[実施例1-10]

MTX- α -PheGly-NH-C₁₀H₂₀O₂-NH₂ (化合物10)の製造

実施例1-9と同様の方法で、N-t-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-t-ブトキシカルボニル-4, 9-ジオキサ-1, 12-ドデカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物300mgを得た。

[0101] ¹H-NMR(400MHz、DMSO-d₆): δ 1. 47-1. 50(4H, m)、1. 54-1. 60(4H, m)、1. 82-1. 95(2H, m)、2. 25-2. 28(2H, m)、2. 58(2H, t, J=6. 6Hz)、2. 82-2. 87(1H, m)、3. 02-3. 07(3H, m)、3. 22(3H, s)、3. 25-3. 41(8H, m)、3. 55(3H, s)、3. 55-3. 63(2H, m)、4. 28-4. 47(2H, m)、4. 79(2H, s)、6. 60(2H, br. s)、6. 81(2H, d, J=8. 8Hz)、7. 09-7. 18(5H, m)、7. 45(1H, br. s)、7. 59(1H, br. t)、7. 66(1H, br. s)、7. 70(2H, d, J=8. 8Hz)、8. 02(1H, d)、8. 08(1H, d)、8. 26(1H, br. t)、8. 56(1H, s)

LC/MS: 859. 3(M+H⁺)

[実施例1-11]

MTX- α -PheGly-NH-C₈H₁₆O₂-NH₂ (化合物11)の製造

実施例1-9と同様の方法で、N-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7-ジオキサ-1, 10-デカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物300mgを得た。

[0102] ¹H-NMR(400MHz、DMSO-d₆): δ 1.53-1.62(4H、m)、1.82-1.92(2H、m)、2.20-2.27(2H、m)、2.50-2.60(2H、t)、2.81-2.86(1H、m)、2.97-3.08(3H、m)、3.22(3H、s)、3.25-3.47(8H、m)、3.55(3H、s)、3.55-3.73(2H、m)、4.24-4.47(2H、m)、4.79(2H、s)、6.60(2H、br. s)、6.81(2H、d)、7.12-7.21(5H、m)、7.45(1H、br. s)、7.60(1H、br. t)、7.63(1H、br. s)、7.69(2H、d)、8.03(1H、d)、8.10(1H、d)、8.28(1H、br. t)、8.56(1H、s)

LC/MS:831.3(M+H⁺)

[実施例1-12]

MTX- α -PheGly-NH-C₆H₁₂O₂-NH₂ (化合物12)の製造

実施例1-9と同様の方法で、N-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-*t*-ブトキシカルボニル-3, 6-ジオキサ-1, 8-オクタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物181mgを得た。

[0103] ¹H-NMR(270MHz、DMSO-d₆): δ 1.83-1.92(2H、m)、2.21-2.27(2H、m)、2.60-2.65(2H、t)、2.75-3.10(2H、m)、3.22(3H、s)、3.23-3.46(10H、m)、3.55(3H、s)、3.55-3.75(2H、m)、4.25-4.52(2H、m)、4.79(2H、s)、6.61(2H、br. s)、6.82(2H、d、J=8.6Hz)、7.10-7.20(5H、m)、7.45(1H、br. s)、7.63-7.72(4H、m)、8.00(1H、d)、8.10(1H、d)、8.27(1H、br. t)、8.56(1H、s)

LC/MS:803.4(M+H⁺)

[実施例1-13]

MTX- α -PheGly-NH-C₄H₈O₂-NH₂ (化合物13)。

[0104] 実施例1-9と同様の方法で、N-*t*-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-*t*-ブトキシカルボニル-3-オキサ-1, 5-ペンタ

ンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物318mgを得た。

[0105] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.82–1.95 (2H, m)、2.22–2.27 (2H, m)、2.59–2.64 (2H, t)、2.73–3.15 (2H, m)、3.23 (3H, s)、3.25–3.38 (6H, m)、3.55 (3H, s)、3.46–3.77 (2H, m)、4.23–4.51 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.62 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7.10–7.17 (5H, m)、7.47 (1H, br. s)、7.63–7.75 (4H, m)、8.02 (1H, d)、8.11 (1H, d)、8.27 (1H, br. t)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 759.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1-14]

MTX- α -PhePro-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物14)の製造

実施例1-2(a)の工程でN-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-プロリンを用いた以外は、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物382mgを得た。

[0106] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.49–2.03 (10H, m)、2.19–2.30 (2H, m)、2.55 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$)、2.62–3.69 (21H, m)、3.55 (3H, s)、4.28–4.38 (1H, m)、4.63–4.75 (1H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7.14–7.29 (5H, m)、7.47 (1H, br. s)、7.66–7.72 (4H, m)、7.94–8.10 (2H, m)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 915.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1-15]

MTX- α -Phe β Ala-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物15)の製造

実施例1-2(a)の工程でN-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ- β -アラニンを用いた以外は、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物180mgを得た。

[0107] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.52–1.62 (4H, m)、1.78–1.95 (2H, m)、2.16–2.22 (4H, m)、2.56 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$)、2.71–3.48 (21H, m)、3.55 (3H, s)、4.10 (2H, br. s)、4.21–4.30 (1H, m)、4.38–4.49 (1H, m)、4.80 (2H, s)、6.59 (2H, br. s)、6.83 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7.10–

7. 21 (5H, m)、7. 43 (1H, br. s)、7. 65–7. 74 (3H, m)、7. 83–7. 89 (2H, m)、7. 96 (1H, br. t)、8. 08 (1H, d, J=6. 8Hz)、8. 56 (1H, s)

LC/MS: 889. 5 (M+H⁺)

[実施例1-16]

MTX- α -Phe β Ala-NH-C₂H₄-NH₂ (化合物16)の製造

実施例1-1(a)の工程でN-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ- β -アラニンを用いた以外は、実施例1-1と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物194mgを得た。

[0108] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1. 80–1. 94 (2H, m)、2. 18–2. 26 (4H, m)、2. 54 (2H, t, J=6. 1Hz)、2. 74–3. 08 (6H, m)、3. 23 (3H, s)、3. 55 (3H, s)、4. 24–4. 48 (2H, m)、4. 80 (2H, s)、6. 59 (2H, br. s)、6. 83 (2H, d, J=8. 4Hz)、7. 13 (5H, s)、7. 45 (1H, br. s)、7. 65–7. 86 (5H, m)、7. 96 (1H, br. t)、8. 09 (1H, d, J=6. 8Hz)、8. 56 (1H, s)

LC/MS: 729. 3 (M+H⁺)

[実施例1-17]

MTX- α -Phe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物17)の製造

実施例1-2(b)の工程を省略した以外は実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物496mgを得た。

[0109] ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ 1. 49–1. 59 (4H, m)、1. 82–1. 89 (2H, m)、2. 19–2. 27 (2H, m)、2. 55 (2H, t, J=7. 2Hz)、2. 73–3. 10 (4H, m)、3. 23 (3H, s)、3. 17–3. 48 (12H, m)、3. 55 (3H, s)、4. 21–4. 28 (1H, m)、4. 38–4. 45 (1H, m)、4. 80 (2H, s)、6. 61 (2H, br. s)、6. 83 (2H, d, J=9. 3Hz)、7. 11–7. 20 (5H, m)、7. 46 (1H, br. s)、7. 66 (1H, br. s)、7. 73 (2H, d, J=9. 0Hz)、7. 83 (1H, t)、7. 92 (1H, d, J=8. 4Hz)、8. 12 (1H, d, J=7. 5Hz)、8. 56 (1H, s)

LC/MS: 818. 4 (M+H⁺)

[実施例1-18]

MTX- α -Ile-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物18)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-イソロイシンを用いて、黄色粉末の標題化合物562mgを得た。

[0110] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO- d_6): δ 0.76–0.80 (6H, m)、0.99–1.10 (1H, m)、1.36–1.45 (1H, m)、1.49–1.73 (5H, m)、1.88–2.07 (2H, m)、2.33–2.38 (2H, m)、2.55 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$)、2.98–3.48 (14H, m)、3.21 (3H, s)、3.56 (3H, s)、4.05–4.13 (1H, m)、4.40–4.48 (1H, m)、4.78 (2H, s)、6.60 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$)、7.46 (1H, br. s)、7.66–7.72 (3H, m)、7.98 (1H, br. t)、8.12 (1H, d, $J=7.6\text{Hz}$)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 784.4 ($M+H^+$)

[実施例1-19]

MTX- α -Ile-NH-C₂H₄-NH₂ (化合物19)

実施例1-18と同様の方法で、N-t-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN-t-ブトキシカルボニル-1, 2-エチレンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物320mgを得た。

[0111] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): δ 0.76–0.80 (6H, m)、0.96–1.08 (1H, m)、1.34–1.48 (1H, m)、1.62–1.70 (1H, m)、1.85–2.03 (2H, m)、2.36 (2H, t, $J=7.8\text{Hz}$)、2.95–3.08 (2H, m)、3.21 (3H, s)、3.56 (3H, s)、4.06–4.12 (1H, m)、4.38–4.45 (1H, m)、4.78 (2H, s)、6.61 (2H, br. s)、6.83 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$)、7.43 (1H, br. s)、7.64–7.72 (4H, m)、7.92 (1H, t, $J=5.7\text{Hz}$)、8.12 (1H, d, $J=7.5\text{Hz}$)、8.57 (1H, s)。

[0112] LC/MS: 624.2 ($M+H^+$)

[実施例1-20]

MTX- α -Glu(OMe)-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物20)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物600mgを得た。

[0113] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1. 50–2. 03 (8H, m)、2. 24–2. 31 (2H, t)、2. 34–2. 40 (2H, t)、2. 49–2. 57 (2H, t)、2. 97–3. 52 (14H, m)、3. 21 (3H, s)、3. 53 (3H, s)、3. 55 (3H, s)、4. 15–4. 36 (2H, m)、4. 78 (2H, s)、6. 61 (2H, br. s)、6. 81 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)、7. 46 (1H, br. s)、7. 67 (1H, br. s)、7. 72 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7. 84 (1H, br. t)、7. 95 (1H, d)、8. 14 (1H, d)、8. 55 (1H, s)

LC/MS: 814. 4 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1–21]

MTX- α -Glu(OMe)-NH-C₂H₄-NH₂ (化合物21)の製造

実施例1–20と同様の方法で、N- ϵ -トキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりにN- ϵ -トキシカルボニル-1, 2-エチレンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物283mgを得た。

[0114] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1. 71–2. 09 (4H, m)、2. 28 (2H, t, $J=7.6\text{Hz}$)、2. 39 (2H, t, $J=7.6\text{Hz}$)、2. 53 (2H, t, $J=6.1\text{Hz}$)、2. 99–3. 05 (2H, m)、3. 21 (3H, s)、3. 54 (3H, s)、3. 56 (3H, s)、4. 14–4. 36 (2H, m)、4. 79 (2H, s)、6. 61 (2H, br. s)、6. 82 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7. 43 (1H, br. s)、7. 65–7. 79 (4H, m)、7. 95 (1H, d, $J=7.8\text{Hz}$)、8. 14 (1H, d, $J=6.9\text{Hz}$)、8. 56 (1H, s)

LC/MS: 654. 1 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1–22]

MTX- α -Tyr-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物22)の製造

実施例1–17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-チロシンを用いて、黄色粉末の標題化合物133mgを得た。

[0115] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1. 51–1. 62 (4H, m)、1. 85–1. 95 (2H, m)、2. 23–2. 31 (2H, m)、2. 51–2. 58 (2H, t)、2. 63–2. 91 (2H, m)、2. 95–3. 16 (2H, m)、3. 22 (3H, s)、3. 27–3. 54 (12H, m)、3. 56 (3H, s)、4. 22–4. 35 (2H, m)、4. 79 (2H, s)、6. 57 (2H, d, $J=8.1\text{Hz}$)、6. 61 (2H,

br. s)、6. 82(2H、d、J=8. 7Hz)、6. 92(2H、d、J=8. 1Hz)、7. 47(1H、br. s)、7. 67–7. 88(5H、m)、8. 13(1H、d)、8. 55(1H、s)

LC/MS:834. 4(M+H⁺)

[実施例1-23]

MTX- α -Trp-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物23)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-トリプトファンを用いて、黄色粉末の標題化合物171mgを得た。

[0116] ¹H-NMR(270MHz、DMSO-d₆): δ 1. 50–1. 61(4H、m)、1. 84–1. 97(2H、m)、2. 23–2. 32(2H、m)、2. 50–2. 56(2H、t)、2. 92–3. 15(4H、m)、3. 22(3H、s)、3. 29–3. 45(12H、m)、3. 55(3H、s)、4. 29–4. 49(2H、m)、4. 78(2H、s)、6. 64(2H、br. s)、6. 80(2H、d)、6. 92(1H、t)、7. 04(1H、t)、7. 10(1H、s)、7. 26(1H、d)、7. 44(1H、br. s)、7. 51(1H、d)、7. 65(1H、br. s)、7. 69(2H、d)、7. 82(1H、br. t)、7. 93(1H、d)、8. 10(1H、d)、8. 55(1H、s)、10. 80(1H、s)

LC/MS:857. 5(M+H⁺)

[実施例1-24]

MTX- α -Ser-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物24)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-セリンを用いて、黄色粉末の標題化合物416mgを得た。

[0117] ¹H-NMR(300MHz、DMSO-d₆): δ 1. 50–1. 63(4H、m)、1. 90–2. 08(4H、m)、2. 39(2H、t、J=7. 8Hz)、2. 55(2H、t、J=6. 6Hz)、3. 05–3. 48(16H、m) 3. 21(3H、s)、3. 56(3H、s)、4. 13–4. 20(1H、m)、4. 33–4. 41(1H、m)、4. 78(2H、s)、6. 61(2H、br. s)、6. 82(2H、d、J=9. 0Hz)、7. 44(1H、br. s)、7. 66–7. 80(5H、m)、8. 19(1H、d、J=6. 9Hz)、8. 56(1H、s)

LC/MS:758. 4(M+H⁺)

[実施例1-25]

MTX- α -Leu-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物25)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-ロイシンを用いて、黄色粉末の標題化合物283mgを得た。

[0118] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 0.80-0.87 (6H, d), 1.43-1.64 (7H, m), 1.90-2.06 (2H, m), 2.34-2.30 (2H, t), 2.53-2.58 (2H, t), 3.04-3.08 (2H, m), 3.21 (3H, s), 3.33-3.47 (12H, m), 3.56 (3H, s), 4.19-4.37 (2H, m), 4.78 (2H, s), 6.62 (2H, br. s), 6.82 (2H, d, J=8.7Hz), 7.45 (1H, br. s), 7.64-7.85 (5H, m), 8.10 (1H, d), 8.55 (1H, s)

LC/MS: 784.4 (M+H⁺)

[実施例1-26]

MTX- α -Val-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物26)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-バリンを用いて、黄色粉末の標題化合物590mgを得た。

[0119] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 0.79 (6H, d, J=6.8Hz), 1.52-1.59 (4H, m), 1.85-2.04 (3H, m), 2.33-2.35 (2H, t), 2.56-2.58 (2H, t), 2.93-3.55 (14H, m), 3.21 (3H, s), 3.56 (3H, s), 4.03-4.08 (1H, m), 4.42-4.47 (1H, m), 4.78 (2H, s), 6.62 (2H, br. s), 6.82 (2H, d, J=8.7Hz), 7.45 (1H, br. s), 7.61-7.72 (4H, m), 7.98 (1H, br. t), 8.13 (1H, d), 8.56 (1H, s)

LC/MS: 770.4 (M+H⁺)

[実施例1-27]

MTX- α -His-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物27)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-ヒスチジンをを用いて、黄色粉末の標題化合物81mgを得た。

[0120] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6): δ 1.49–1.58 (4H, m)、1.90–2.04 (2H, m)、2.39 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$)、2.55 (2H, t, $J=6.9\text{Hz}$)、2.83 (2H, m)、3.02 (2H, m)、3.16–3.47 (12H, m)、3.23 (3H, s)、3.57 (3H, s)、4.22 (1H, m)、4.32 (1H, m)、4.80 (2H, s)、6.61 (2H, br. s)、6.72 (1H, s)、6.84 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$)、7.10–7.70 (5H, m)、7.77 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)、8.36 (1H, br)、8.57 (1H, s)

LC/MS: 808.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1–28]

MTX- α -Pro-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物28)の製造

実施例1–17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-プロリンを用いて、黄色粉末の標題化合物683mgを得た。

[0121] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.58 (4H, dd, $J=6.5\text{Hz}$, $J=12.8\text{Hz}$)、1.69–2.10 (6H, m)、2.44 (2H, t, $J=7.7\text{Hz}$)、2.60 (2H, t, $J=6.8\text{Hz}$)、2.91–3.75 (19H, m)、3.57 (3H, s)、4.18–4.25 (1H, m)、4.61–4.72 (1H, m)、4.77 (2H, s)、6.61 (2H, br. s)、6.80 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)、7.44 (1H, br. s)、7.69–7.80 (4H, m)、8.15 (1H, d, $J=7.1\text{Hz}$)、8.55 (1H, s)

LC/MS: 768.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1–29]

MTX- α - β Ala-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物29)の製造

実施例1–17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ- β -アラニンを用いて、黄色粉末の標題化合物230mgを得た。

[0122] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.49–1.62 (4H, m)、1.79–2.02 (2H, m)、2.21 (2H, t, $J=6.9\text{Hz}$)、2.32 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$)、2.56 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$)、3.00–3.61 (19H, m)、3.55 (3H, s)、4.29–4.38 (1H, m)、4.78 (2H, s)、6.61 (2H, br. s)、6.81 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7.43 (1H, br. s)、

7. 61–7. 91 (3H, m)、7. 72 (2H, d, J=8. 6Hz)、8. 02 (1H, d, J=7. 8Hz)、
8. 55 (1H, s)

LC/MS: 742. 4 (M+H⁺)

[実施例1–30]

MTX- γ -PhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物30)の製造

実施例1–2と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- α -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物312mgを得た。

[0123] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1. 49–1. 60 (4H, m)、1. 76–1. 98 (2H, m)、2. 09–2. 20 (2H, m)、2. 56 (2H, t, J=6. 6Hz)、2. 62–3. 16 (6H, m)、3. 21 (3H, s)、3. 27–3. 48 (12H, m)、3. 59 (3H, s)、4. 27–4. 53 (3H, m)、4. 78 (2H, s)、6. 61 (2H, br. s)、6. 81 (2H, d, J=8. 6Hz)、7. 16–7. 23 (10H, m)、7. 48 (1H, br. s)、7. 68–7. 74 (3H, m)、7. 83 (1H, br. t)、8. 01 (1H, d, J=7. 9Hz)、8. 10 (1H, d, J=7. 8Hz)、8. 36 (1H, d, J=6. 8Hz)、8. 55 (1H, s)

LC/MS: 965. 5 (M+H⁺)

[実施例1–31]

MTX- γ -PhePhe-NH-C₆H₁₂O₂-NH₂ (化合物31)の製造

実施例1–5と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- α -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物80mgを得た。

[0124] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1. 75–1. 97 (2H, m)、2. 08–2. 17 (2H, m)、2. 59–2. 62 (2H, t)、2. 58–3. 05 (6H, m)、3. 22 (3H, s)、3. 15–3. 52 (8H, m)、3. 59 (3H, s)、4. 23–4. 52 (3H, m)、4. 78 (2H, s)、6. 63 (2H, br. s)、6. 81 (2H, d, J=8. 7Hz)、7. 11–7. 21 (10H, m)、7. 44 (1H, br. s)、7. 65 (1H, br. s)、7. 70 (2H, d)、7. 94–8. 12 (3H, m)、8. 35 (1H, d)、8. 55 (1H, s)

LC/MS: 893. 5 (M+H⁺)

[実施例1-32]

MTX- γ -PhePhe-NH-C₄H₈O-NH₂ (化合物32)の製造

実施例1-6と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- α -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物49mgを得た。

[0125] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1.73-1.97 (2H, m)、2.08-2.18 (2H, m)、2.60-2.65 (2H, t)、2.59-3.02 (6H, m)、3.21 (3H, s)、3.13-3.44 (4H, m)、3.59 (3H, s)、4.25-4.53 (3H, m)、4.78 (2H, s)、6.63 (2H, br. s)、6.81 (2H, d, J=8.7Hz)、7.09-7.25 (10H, m)、7.43 (1H, br. s)、7.66 (1H, br. s)、7.72 (2H, d, J=8.4Hz)、7.95-8.10 (3H, m)、8.36 (1H, d)、8.55 (1H, s)

LC/MS: 849.5 (M+H⁺)

[実施例1-33]

MTX- γ -PheGly-NH-C₁₀H₂₀O-NH₂ (化合物33)の製造

実施例1-9と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- α -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物693mgを得た。

[0126] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1.50-1.68 (4H, m)、1.80-2.02 (2H, m)、2.12-2.27 (2H, m)、2.55 (2H, t, J=6.4Hz)、2.71-2.79 (1H, m)、2.96-3.14 (3H, m)、3.22 (3H, s)、3.38-3.74 (12H, m)、3.59 (3H, s)、4.28-4.48 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.62 (2H, br. s)、6.81 (2H, d, J=8.4Hz)、7.14-7.28 (5H, m)、7.47 (1H, br. s)、7.63-7.73 (4H, m)、8.19 (1H, d, J=7.6Hz)、8.29-8.36 (2H, m)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 875.4 (M+H⁺)

[実施例1-34]

MTX- γ -Phe-NH-C₁₀H₂₀O-NH₂ (化合物34)の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- α -メチルエステルを用

いて、黄色粉末の標題化合物480mgを得た。

[0127] $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6): δ 1.49–1.58 (4H, m)、1.79–2.00 (2H, m)、2.10–2.27 (2H, m)、2.55 (2H, t, $J=6.9\text{Hz}$)、2.69–2.93 (2H, m)、2.96–3.12 (2H, m)、3.22 (3H, s)、3.26–3.48 (12H, m)、3.59 (3H, s)、4.25–4.33 (1H, m)、4.38–4.46 (1H, m)、4.79 (2H, s)、6.62 (2H, br. s)、6.81 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)、7.10–7.24 (5H, m)、7.44 (1H, br)、7.70 (1H, br)、7.72 (2H, d, $J=8.7\text{Hz}$)、7.95 (1H, t)、8.10 (1H, d, $J=8.1\text{Hz}$)、8.35 (1H, d, $J=6.9\text{Hz}$)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 818.4 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1-35]

MTX- γ -Glu(OMe)-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物35)の製造

実施例1-20と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- γ -メチルエステル代わりにN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- α -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物438mgを得た。

[0128] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.52–2.06 (8H, m)、2.22–2.30 (4H, m)、2.53–2.58 (2H, t)、3.03–3.15 (2H, m)、3.22 (3H, s)、3.25–3.54 (12H, m)、3.56 (3H, s)、3.61 (3H, s)、4.13–4.40 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.63 (2H, br. s)、6.81 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$)、7.44 (1H, br. s)、7.67 (1H, br. s)、7.72 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$)、7.90 (1H, br. t)、7.99 (1H, d)、8.37 (1H, d)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 814.5 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[実施例1-36]

MTX- α -D-Phe-D-Phe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物36)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-D-フェニルアラニンを用いて、黄色粉末の標題化合物313mgを得た。

[0129] $^1\text{H-NMR}$ (270MHz, DMSO-d_6): δ 1.40–1.59 (4H, m)、1.74–1.83 (2H, m)、2.04–2.11 (2H, m)、2.56–2.58 (2H, t)、2.59–3.12 (6H, m)、3

. 21 (3H, s)、3. 17–3. 51 (12H, m)、3. 55 (3H, s)、4. 24–4. 44 (3H, m)、
4. 78 (2H, s)、6. 62 (2H, br. s)、6. 81 (2H, d, J=8. 6Hz)、7. 10–7. 26 (10
H, m)、7. 45 (2H, m)、7. 64 (1H, br. s)、7. 72 (2H, d, J=8. 4Hz)、8. 18 (2H, m)、8. 43 (1H, d)、8. 55 (1H, s)

LC/MS: 965. 6 (M+H⁺)

[実施例1-37]

MTX- γ -D-Phe-D-Phe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物37)の製造

実施例1-30と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-D-フェニルアラニンを用いて、黄色粉末の標題化合物85 mgを得た。

[0130] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1. 51–1. 61 (4H, m)、1. 74–2. 02 (2H, m)、2. 11–2. 16 (2H, m)、2. 54–2. 59 (2H, t)、2. 62–3. 12 (6H, m)、3. 22 (3H, s)、3. 25–3. 53 (12H, m)、3. 60 (3H, s)、4. 31–4. 46 (3H, m)、4. 79 (2H, s)、6. 61 (2H, br. s)、6. 81 (2H, d, J=8. 6Hz)、7. 08–7. 26 (10H, m)、7. 44 (1H, br. s)、7. 66–7. 77 (4H, m)、8. 06 (2H, m)、8. 36 (1H, d)、8. 56 (1H, s)

LC/MS: 965. 6 (M+H⁺)

[実施例1-38]

MTX- α -AsnPhePhe-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物38)の製造

通常のペプチド合成法に従ってペプチド鎖を伸張し、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物145mgを得た。

[0131] ¹H-NMR (270MHz, DMSO-d₆): δ 1. 52–1. 59 (4H, m)、1. 87–2. 02 (2H, m)、2. 32–3. 48 (24H, m)、3. 22 (3H, s)、3. 55 (3H, s)、4. 24–4. 56 (4H, m)、4. 79 (2H, s)、6. 60 (2H, br. s)、6. 81 (2H, d, J=8. 6Hz)、7. 04–7. 75 (17H, m)、8. 07–8. 26 (4H, m)、8. 56 (1H, s)

LC/MS: 1079. 5 (M+H⁺)

[実施例1-39]

MTX- α / γ -GlyPheLeuGly-NH-C₁₀H₂₀O₃-NH₂ (化合物39)の製造

通常のペプチド合成法に従ってペプチド鎖を伸張し、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の化合物723mgを得た。LC/MS解析により、精製過程で異性化を生じ α/γ の混合物($\alpha:\gamma=3:1$)となっていること(化合物39)を確認した。

[0132] LC/MS:1045.7(M+H⁺)

[実施例2-1]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)にテトラヒドロフラン(THF)(10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOOBt)(0.125mmol)及び実施例1-1で得られた化合物1(0.031mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミン(0.094mmol)を超純水とTHFの等量混合液(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約195万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、2.1%であった。

[0133] この水溶液に、塩化ナトリウム(6g)を超純水(160mL)に溶解した液を添加したのち、エタノール(400mL)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(500mL)に溶解し、塩化ナトリウム(15g)を添加したのち、0.45 μ mのフィルター(ステリベックスHV:ミリポア)でろ過し、以後無菌的にろ液にエタノール(1000mL)を滴下してエタノール析出を行い、析出物をろ取り真空乾燥した。この析出物をリン酸緩衝液(2mMリン酸ナトリウム、154mM塩化ナトリウム

、pH7. 2) (40mL) に溶解し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約186万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、2. 1%であった。

[0134] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1. 83(m)、2. 01(br. s)、2. 13(m)、2. 49(m)、2. 68(m)、2. 95(m)、3. 35(br. s)、3. 51(br. s)、3. 56(br. s)、3. 71(br. s)、3. 82(br. s)、4. 16(t)、4. 46(br. s)、4. 54(br. d)、4. 88(d)、4. 99(d)、6. 63(d)、6. 87–7. 11(m)、7. 73(d)、8. 69(s)

[実施例2-2]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-1で得られた化合物1(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約228万、MTXの結合率は1. 9%であった。

[0135] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約218万、MTXの結合率は1. 9%であった。

[0136] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1. 84(m)、2. 01(br. s)、2. 13(m)、2. 49(t)、2. 68(m)、2. 95(m)、3. 36(br. d)、3. 51(br. d)、3. 56(br. s)、3. 71(br. s)、3. 83(br. s)、4. 16(t)、4. 46(br. d)、4. 55(br. d)、4. 88(d)、4. 98(d)、6. 63(d)、6. 87–7. 13(m)、7. 74(d)、8. 70(s)

[実施例2-2']

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-1で得られた化合物1(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約219万、MTXの結合率は2. 2%であった。

[0137] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌

水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約206万、MTXの結合率は2.3%であった。

[0138] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 1.83(m)、2.01(br. s)、2.14(m)、2.52(m)、2.70(m)、2.96(m)、3.35(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.16(t)、4.46(br. s)、4.55(br. s)、4.87(d)、4.97(d)、6.66(d)、6.88–7.09(m)、7.72(d)、8.69(s)

[実施例2-3]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)にテトラヒドロフラン(THF)(10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOObt)(0.125mmol)及び実施例1-1で得られた化合物1(0.008mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミン(0.118mmol)を超純水とTHFの等量混合液(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約232万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、0.6%であった。

[0139] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約217万、MTXの結合率は0.5%であった。

[0140] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 2.01(br. s)、2.52(m)、2.69(m)、2.95(m)

)、3. 34(br. d)、3. 51(br. s)、3. 57(br. s)、3. 71(br. s)、3. 83(br. s)、4. 16(t)、4. 46(br. s)、4. 55(br. s)、6. 66(d)、6. 87–7. 10(m)、7. 72(d)、8. 69(s)

[実施例2-4]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)にテトラヒドロフラン(THF)(10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOOBt)(0. 125mmol)及び実施例1-1で得られた化合物1(0. 015mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミン(0. 110mmol)を超純水とTHFの等量混合液(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0. 125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0. 09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3. 5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約232万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、1. 1%であった。

[0141] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約223万、MTXの結合率は1. 1%であった。

[0142] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1. 84(m)、2. 01(br. s)、2. 13(m)、2. 52(m)、2. 70(m)、2. 96(m)、3. 35(br. s)、3. 51(br. s)、3. 57(br. s)、3. 71(br. s)、3. 83(br. s)、4. 16(t)、4. 46(br. s)、4. 55(br. s)、6. 66(d)、6. 88–7. 09(m)、7. 72(d)、8. 69(s)

[実施例2-5]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)にテトラヒドロフラン(THF)(10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOOBt)(0.125mmol)及び実施例1-1で得られた化合物1(0.020mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミン(0.105mmol)を超純水とTHFの等量混合液(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約227万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、1.4%であった。

[0143] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約209万、MTXの結合率は1.3%であった。

[0144] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.84(m)、2.01(br. s)、2.13(m)、2.49(t)、2.68(m)、2.95(m)、3.36(br. s)、3.51(br. s)、3.56(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.16(t)、4.46(br. s)、4.55(br. d)、4.88(d)、4.98(d)、6.63(d)、6.87-7.13(m)、7.74(d)、8.70(s)

[実施例2-6]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)にテトラヒドロフラン(THF)(

10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOObt) (0.125mmol)及び実施例1-1で得られた化合物1 (0.063mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミン(0.063mmol)を超純水とTHFの等量混合液(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC) (0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約205万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、3.9%であった。

[0145] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約191万、MTXの結合率は3.8%であった。

[0146] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) : δ 1.84(m)、2.02(br. s)、2.15(m)、2.53(t)、2.70(m)、2.96(m)、3.35(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.16(t)、4.46(br. s)、4.55(br. s)、4.89(s)、4.96(d)、6.66(d)、6.87-7.10(m)、7.72(d)、8.68(s)

[実施例2-7]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)にテトラヒドロフラン(THF) (10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOObt) (0.125mmol)及び実施例1-1で得られた化合物1 (0.125mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、超純水とT

HFの等量混合液(10ml)を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約197万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、4.5%であった。

[0147] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約174万、MTXの結合率は4.4%であった。

[0148] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 1.83(m)、1.93(m)、2.02(br. s)、2.14(m)、2.53(t)、2.69(m)、2.95(m)、3.35(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.16(t)、4.46(br. s)、4.55(br. d)、4.87(d)、4.95(d)、6.67(d)、6.87-7.10(m)、7.71(d)、8.68(s)

[実施例2-8]

MTX- α -PhePhe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-2で得られた化合物2(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約211万、MTXの結合率は1.6%であった。

[0149] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約198万、MTXの結合率は1.4%であった。

[実施例2-9]

MTX- α -PhePhe-NHC₁₀H₂₀O₂NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-3で得られた化合物3(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約183万、MTXの結合率は1.8%であった。

[0150] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約155万、MTXの結合率は1.7%であった。

[実施例2-10]

MTX- α -PhePhe-NHC₈H₁₆O₂NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-4で得られた化合物4(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約189万、MTXの結合率は1.6%であった。

[0151] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約162万、MTXの結合率は1.6%であった。

[実施例2-11]

MTX- α -PhePhe-NHC₆H₁₂O₂NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-5で得られた化合物5(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約192万、MTXの結合率は1.9%であった。

[0152] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約162万、MTXの結合率は2.0%であった。

[0153] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.77-1.85(m)、2.02(br. s)、2.16-2.24(m)、2.51(m)、2.66(m)、2.92(m)、3.00(m)、3.35(br. s)、3.51(br. s)

、3. 57(br. s)、3. 72(br. s)、3. 83(br. s)、4. 20(m)、4. 46(br. s)、4. 55(b
r. s)、6. 68(d)、6. 95–7. 18(m)、7. 76(d)、8. 72(s)

[実施例2–12]

MTX- α -PhePhe-NHC₄H₈ONH-HAの製造

実施例2–1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1–6で得られた化合物6(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2–1と同様の方法で求めた分子量は約172万、MTXの結合率は2. 0%であった。

[0154] この水溶液を実施例2–1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2–1と同様の方法で求めた分子量は約149万、MTXの結合率は1. 9%であった。

[0155] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1. 77–1. 84(m)、2. 01(br. s)、2. 20–2. 28(m)、2. 49(m)、2. 64(m)、2. 93(m)、3. 00(m)、3. 35(br. s)、3. 52(br. s)、3. 58(br. s)、3. 73(br. s)、3. 83(br. s)、4. 20(t)、4. 47(br. s)、4. 55(br. s)、4. 92(d)、5. 06(d)、6. 64(d)、6. 94–7. 19(m)、7. 77(d)、8. 73(s)

[実施例2–13]

MTX- α -PhePhe-NHC₅H₁₀NH-HAの製造

実施例2–1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1–7で得られた化合物7(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2–1と同様の方法で求めた分子量は約214万、MTXの結合率は1. 4%であった。

[0156] この水溶液を実施例2–1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2–1と同様の方法で求めた分子量は約196万、MTXの結合率は1. 2%であった。

[実施例2–14]

MTX- α -PhePhe-Lys-HAの製造

実施例2–1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1–8で得られた化合物8(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX

結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約189万、MTXの結合率は1.4%であった。

- [0157] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約172万、MTXの結合率は1.4%であった。

[実施例2-15]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約80万)と実施例1-2で得られた化合物2(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約83万、MTXの結合率は1.4%であった。

- [0158] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約80万、MTXの結合率は1.4%であった。

[実施例2-16]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約80万)にテトラヒドロフラン(THF)(10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOObt)(0.125mmol)及び実施例1-2で得られた化合物2(0.009mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミン(0.116mmol)を超純水とTHFの等量混合液(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を大塚生理食塩水(4

0mL)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約83万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、0.5%であった。

- [0159] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約81万、MTXの結合率は0.5%であった。

[実施例2-17]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約80万)にテトラヒドロフラン(THF)(10ml)を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HOObt)(0.125mmol)及び実施例1-2で得られた化合物2(0.125mmol)を超純水とTHFの等量混合液(20ml)に溶解した液を添加した後、超純水とTHFの等量混合液(10ml)を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約77万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、3.4%であった。

- [0160] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約76万、MTXの結合率は3.4%であった。

[実施例2-18]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-9で得られた化合物9(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約199万、MTXの結合率は1.5%であった。

[0161] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約186万、MTXの結合率は1.4%であった。

[0162] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.59(m)、1.78(m)、1.90–1.95(m)、2.02(br. s)、2.13–2.23(m)、2.99–3.14(m)、3.28(s)、3.35(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.26(t)、4.46(br. s)、4.54(br. s)、4.92(s)、6.93(d)、7.13–7.20(m)、7.66(d)、8.69(s)

[実施例2-19]

MTX- α -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₂NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-10で得られた化合物10(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。

[0163] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約144万、MTXの結合率は1.8%であった。

[0164] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.49(m)、1.60(m)、1.76(m)、2.01(br. s)、2.09–2.15(m)、2.20–2.28(m)、2.99–3.09(m)、3.10–3.17(m)、3.33(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.30(m)、4.46(br. s)、4.55(br. d)、4.97(s)、6.91(d)、7.13(m)、7.17–7.21(m)、7.67(d)、8.73(s)

[実施例2-20]

MTX- α -PheGly-NHC₈H₁₆O₂NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万

）と実施例1-11で得られた化合物11 (0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約173万、MTXの結合率は1.6%であった。

[0165] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約150万、MTXの結合率は1.6%であった。

[0166] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 1.64(m)、1.78(m)、2.01(br. s)、2.09-2.17(m)、2.24(m)、3.01(m)、3.08(m)、3.16(m)、3.34(br. s)、3.51(br. s)、3.56(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.31(m)、4.46(br. s)、4.54(br. s)、4.97(s)、6.91(d)、7.11(m)、7.14-7.21(m)、7.67(d)、8.72(s)

[実施例2-21]

MTX- α -PheGly-NHC₆H₁₂O₂NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-12で得られた化合物12(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約150万、MTXの結合率は2.3%であった。

[0167] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約139万、MTXの結合率は2.3%であった。

[実施例2-22]

MTX- α -PheGly-NHC₄H₈ONH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-13で得られた化合物13(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約156万、MTXの結合率は2.0%であった。

[0168] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約140万、MTXの結合

率は2.2%であった。

[実施例2-23]

MTX- α -PhePro-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-14で得られた化合物14(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約166万、MTXの結合率は1.6%であった。

- [0169] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約152万、MTXの結合率は1.6%であった。

[実施例2-24]

MTX- α -Phe β Ala-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-15で得られた化合物15(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。

- [0170] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約152万、MTXの結合率は1.5%であった。

[実施例2-25]

MTX- α -Phe β Ala-NHC₂H₄NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-16で得られた化合物16(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約209万、MTXの結合率は2.3%であった。

- [0171] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約198万、MTXの結合率は2.3%であった。

[実施例2-26]

MTX- α -Phe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-17で得られた化合物17(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約213万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0172] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約179万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0173] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.63(m)、1.79(m)、2.02(br. s)、2.20(m)、2.28(m)、3.08(m)、3.10-3.20(m)、3.31(s)、3.35(br. s)、3.52(br. s)、3.56(br. s)、3.72(br. s)、3.84(br. s)、4.28(t)、4.47(br. s)、4.54(br. s)、4.97(s)、6.94(d)、7.06(t)、7.13(d)、7.67(d)、8.73(s)

[実施例2-27]

MTX- α -Ile-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-18で得られた化合物18(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約192万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0174] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約162万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0175] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 0.84(t)、0.89(d)、1.18(m)、1.47(m)、1.78(m)、1.83-1.90(m)、2.02(br. s)、2.36(m)、3.24(s)、3.35(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.63(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.09(d)、4.45(br. s)、4.55(br. s)、4.93(s)、6.92(d)、7.72(d)、8.68(s)

[実施例2-28]

MTX- α -Ile-NHC₂H₄NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万

）と実施例1-19で得られた化合物19(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約231万、MTXの結合率は2.1%であった。

[0176] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約202万、MTXの結合率は2.1%であった。

[実施例2-29]

MTX- α -Glu-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-20で得られた化合物20(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約201万、MTXの結合率は1.5%であった。

[0177] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約183万、MTXの結合率は1.5%であった。

[0178] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.57(m)、1.77(m)、2.02(br. s)、2.25(m)、2.37(t)、3.24(s)、3.25(s)、3.35(br. s)、3.51(br. s)、3.56(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.13(m)、4.22(m)、4.36(m)、4.46(br. s)、4.55(br. s)、4.91(s)、6.94(d)、7.76(d)、8.66(s)、8.68(s)

注:下線部分はマイナーシグナルであり、これにより α 体と γ 体の混合物と推定した。

[実施例2-30]

MTX- α -Glu-NHC₂H₄NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-21で得られた化合物21(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約226万、MTXの結合率は2.1%であった。

[0179] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約206万、MTXの結合

率は2.1%であった。

[実施例2-31]

MTX- α -Tyr-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-22で得られた化合物22(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約190万、MTXの結合率は1.6%であった。

[0180] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約176万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0181] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.63(m)、1.77(m)、2.02(br. s)、2.23-2.35(m)、2.95(m)、3.03-3.21(m)、3.34(br. s)、3.51(br. s)、3.58(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.28(m)、4.47(br. d)、4.54(br. s)、4.92(s)、6.58(d)、6.94(d)、7.66(d)、8.68(s)

[実施例2-32]

MTX- α -Trp-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-23で得られた化合物23(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約187万、MTXの結合率は1.9%であった。

[0182] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約139万、MTXの結合率は1.9%であった。

[0183] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.53(m)、1.74(m)、2.01(br. s)、2.09-2.15(m)、2.46(m)、2.85(m)、3.05(m)、3.35(br. s)、3.52(br. s)、3.58(br. s)、3.74(br. s)、3.83(br. s)、4.27(m)、4.48(br. d)、4.55(br. s)、6.83(d)、6.99(s)、7.05(s)、7.15(d)、7.43(d)、7.49(s)、8.74(s)

[実施例2-33]

MTX- α -Ser-NHC_{10 20 3}H₂O NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-24で得られた化合物24(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約186万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0184] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約165万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0185] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.61(m)、1.76(m)、2.02(br. s)、2.38(t)、2.51(m)、3.24(s)、3.25(s)、3.35(br. s)、3.50(br. s)、3.56(br. s)、3.58(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.28(m)、4.39(m)、4.46(br. s)、4.54(br. s)、4.91(s)、6.93(d)、7.70(d)、7.76(d)、8.66(s)、8.68(s)
注:下線部分はマイナーシグナルであり、これにより α 体と γ 体の混合物と推定した。

[実施例2-34]

MTX- α -Leu-NHC_{10 20 3}H₂O NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-25で得られた化合物25(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約189万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0186] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約147万、MTXの結合率は1.6%であった。

[0187] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 0.84(d)、0.89(d)、1.52-1.68(m)、1.72-1.83(m)、2.01(br. s)、2.45(t)、3.34(br. s)、3.50(br. s)、3.57(br. s)、3.72(br. s)、3.83(br. s)、4.28(m)、4.45(br. d)、4.54(br. s)、4.95(s)、6.91(d)、7.72(d)、8.69(s)

[実施例2-35]

MTX- α -Val-NHC_{10 20 3}H₂O NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-26で得られた化合物26(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約187万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0188] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約156万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0189] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 0.93(m)、1.78(m)、2.01(br. s)、2.11-2.19(m)、2.47(m)、3.24(s)、3.34(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.63(br. s)、3.72(br. s)、3.83(br. s)、4.02(d)、4.47(br. d)、4.54(br. s)、4.95(s)、6.91(d)、7.72(d)、8.69(s)

[実施例2-36]

MTX- α -His-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-27で得られた化合物27(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約191万、MTXの結合率は1.2%であった。

[0190] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約162万、MTXの結合率は1.2%であった。

[0191] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O): δ 1.70(m)、1.79(m)、2.01(br. s)、2.23-2.36(m)、3.13-3.22(m)、3.26(s)、3.34(br. s)、3.50(br. s)、3.56(br. s)、3.61(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)、4.33(t)、4.46(br. d)、4.54(br. s)、4.96(s)、6.92(d)、7.30(s)、7.73(d)、8.57(s)、8.70(s)

[実施例2-37]

MTX- α -Pro-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-28で得られた化合物28(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MT

X結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約167万、MTXの結合率は1.5%であった。

- [0192] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約152万、MTXの結合率は1.6%であった。

[実施例2-38]

MTX- α - β Ala-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-29で得られた化合物29(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約191万、MTXの結合率は1.7%であった。

- [0193] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約143万、MTXの結合率は1.7%であった。

- [0194] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.60(m)、1.67(m)、1.79(m)、2.01(br. s)、2.42(m)、2.47(m)、3.09(t)、3.14(t)、3.34(br. s)、3.51(br. s)、3.57(br. s)、3.73(br. s)、3.82(br. s)、4.47(br. s)、4.54(br. d)、4.96(s)、6.92(d)、7.73(d)、8.70(s)

[実施例2-39]

MTX- γ -PhePhe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-30で得られた化合物30(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約209万、MTXの結合率は1.5%であった。

- [0195] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約188万、MTXの結合率は1.5%であった。

- [0196] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.52(m)、1.81(m)、2.02(br. s)、2.16-2

. 29(m)、2. 60(m)、2. 76(m)、2. 99(m)、3. 07(m)、3. 18–3. 26(m)、3. 32(s)、3. 35(br. s)、3. 52(br. s)、3. 56(br. s)、3. 66(br. s)、3. 73(br. s)、3. 84(br. s)、4. 15(t)、4. 27(t)、4. 36(m)、4. 47(br. s)、4. 55(br. d)、6. 86(d)、6. 92–6. 99(m)、7. 02–7. 16(m)、7. 79(d)、8. 71(s)

[実施例2-40]

MTX- γ -PhePhe-NHC₆H₁₂O₂NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-31で得られた化合物31(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約189万、MTXの結合率は2. 0%であった。

[0197] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約176万、MTXの結合率は2. 0%であった。

[0198] ¹H-NMR(500MHz、D₂O): δ 2. 02(br. s)、2. 15–2. 24(m)、2. 60(m)、2. 74–2. 83(m)、3. 12–3. 19(m)、3. 20–3. 23(m)、3. 29(s)、3. 35(br. s)、3. 51(br. s)、3. 57(br. s)、3. 71(br. s)、3. 83(br. s)、4. 21(t)、4. 26(t)、4. 32(m)、4. 46(br. s)、4. 55(br. d)、6. 84(s)、6. 93(d)、7. 00–7. 13(m)、7. 76(d)、8. 64(s)

[実施例2-41]

MTX- γ -PhePhe-NHC₄H₈ONH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-32で得られた化合物32(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約196万、MTXの結合率は2. 1%であった。

[0199] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約180万、MTXの結合率は2. 1%であった。

[実施例2-42]

MTX- γ -PheGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-33で得られた化合物33(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約190万、MTXの結合率は1.4%であった。

[0200] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約172万、MTXの結合率は1.5%であった。

[0201] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.69(m)、1.79(m)、2.02(br. s)、2.19-2.26(m)、2.29(m)、2.66(m)、2.82(m)、3.13(m)、3.20(m)、3.29(s)、3.34(br. s)、3.51(br. s)、3.56(br. s)、3.71(br. s)、3.83(br. s)4.16(t)、4.33(m)、4.46(br. s)、4.54(br. s)、4.94(d)、6.82(s)、6.99-7.08(m)、7.75(d)、8.68(s)

[実施例2-43]

MTX- γ -Phe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-34で得られた化合物34(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約187万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0202] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約165万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0203] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.44(m)、1.80(m)、2.02(br. s)、2.31(m)、2.53(m)、2.68(m)、2.88(m)、3.01(m)、3.13(m)、3.18(m)、3.31(s)、3.35(br. s)、3.51(br. s)、3.58(br. s)、3.63(br. s)、3.72(br. s)、3.84(br. s)、4.02(t)、4.37(m)、4.47(br. s)、4.55(br. s)、4.86(d)、4.98(d)、6.76(d)、7.02-7.09(m)、7.78(d)、8.72(s)

[実施例2-44]

MTX- γ -Glu-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-35で得られた化合物35(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約179万、MTXの結合率は1.6%であった。

[0204] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約149万、MTXの結合率は1.7%であった。

[0205] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.61-1.71(m)、1.73-1.88(m)、2.01(br. s)、2.23(m)、2.32(t)、2.38-2.55(m)、3.07(m)、3.34(br. s)、3.51(br. s)、3.56(br. s)、3.73(br. s)、3.83(br. s)4.15(m)、4.46(br. s)、4.55(br. s)、4.95(s)、6.91(d)、7.70(d)、8.71(s)

[実施例2-45]

MTX- α -D-Phe-D-Phe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-36で得られた化合物36(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約148万、MTXの結合率は1.4%であった。

[0206] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約135万、MTXの結合率は1.4%であった。

[実施例2-46]

MTX- γ -D-Phe-D-Phe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-37で得られた化合物37(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約160万、MTXの結合率は1.4%であった。

[0207] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌

水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約141万、MTXの結合率は1.3%であった。

[実施例2-47]

MTX- α -AsnPhePhe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-38で得られた化合物38(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約210万、MTXの結合率は1.3%であった。

[0208] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約178万、MTXの結合率は1.2%であった。

[0209] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1.60(m)、1.80(m)、2.02(br. s)、2.34(m)、2.54(m)、2.60-3.05(m)、3.35(br. s)、3.52(br. s)、3.57(br. s)、3.64(br. s)、3.72(br. s)、3.83(br. s)、4.28(m)、4.46(br. s)、4.55(br. s)、6.61(d)、6.77(t)、6.82-7.36(m)、7.76(d)、7.80(d)、8.61(s)、8.64(s)

注:下線部分はマイナーシグナルであり、これにより α 体と γ 体の混合物と推定した。

[実施例2-48]

MTX- α / γ -GlyPheLeuGly-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約230万)と実施例1-39で得られた化合物39(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約206万、MTXの結合率は1.4%であった。

[0210] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約185万、MTXの結合率は1.3%であった。

[0211] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 0.72(d)、0.77(d)、0.81(d)、1.32(m)、1.50(m)、1.67-1.82(m)、2.01(br. s)、2.23(m)、2.33(m)、2.75-3.03

(m)、3. 51(br. s)、3. 58(br. s)、3. 71(br. s)、3. 83(br. s)、4. 16–4. 28(m)、4. 46(br. s)、4. 54(br. s)、6. 85(d)、6. 92–7. 06(m)、7. 75(d)、7. 78(d)、8. 63(s)、8. 65(s)

注：下線部分はマイナーシグナルであり、これにより α 体と γ 体の混合物と推定した。

[実施例2-49]

MTX- α -PhePhe-NHC₁₀H₂₀O₃NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約32万)と実施例1-2で得られた化合物2(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。

[0212] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約33万、MTXの結合率は1. 1%であった。

[0213] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1. 67(m)、1. 79(m)、1. 84–1. 94(m)、2. 02(br. s)、2. 12–2. 20(m)、2. 59(m)、2. 77(m)、2. 91(m)、2. 99(m)、3. 12–3. 25(m)、3. 35(br. s)、3. 49(br. s)、3. 51(br. s)、3. 57(br. s)、3. 71(br. s)、3. 83(br. s)4. 18(t)、4. 45(br. d)、4. 55(br. d)、4. 88(d)、4. 96(d)、6. 76(d)、6. 95–7. 10(m)、7. 72(d)、8. 68(s)

[実施例2-50]

MTX- α -PhePhe-NHC₂H₄NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg, 分子量:約34万)と実施例1-1で得られた化合物1(0. 031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約34万、MTXの結合率は2. 0%であった。

[0214] この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約34万、MTXの結合率は1. 9%であった。

[0215] ¹H-NMR(500MHz, D₂O): δ 1. 83(m)、2. 01(br. s)、2. 12(m)、2. 52(t)、2. 69(m)、2. 95(m)、3. 34(br. d)、3. 49(br. d)、3. 57(br. s)、3. 70(br.

s)、3. 83(br. s)、4. 16(t)、4. 45(br. d)、4. 54(br. d)、4. 87(d)、4. 96(d)、
6. 66(d)、6. 88–7. 09(m)、7. 72(d)、8. 68(s)

上記実施例2-1～2-50で得られた本発明のHA-MTX結合体を以下の表にまとめた。

[0216] [表1-1]

| | 結合位置 (α/γ) | ペプチド鎖を含有するリンカー | 水溶液 | | 無菌水溶液 | |
|---------|-----------------------------|---|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| | | | MTXの 結合率 (%) | 結合体の 分子量 (ダルトン) | MTXの 結合率 (%) | 結合体の 分子量 (ダルトン) |
| 実施例2-1 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 195万 | 2.1 | 186万 |
| 実施例2-2 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.9 | 228万 | 1.9 | 218万 |
| 実施例2-2' | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.2 | 219万 | 2.3 | 206万 |
| 実施例2-3 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 0.6 | 232万 | 0.5 | 217万 |
| 実施例2-4 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.1 | 232万 | 1.1 | 223万 |
| 実施例2-5 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.4 | 227万 | 1.3 | 209万 |
| 実施例2-6 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 3.9 | 205万 | 3.8 | 191万 |
| 実施例2-7 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 4.5 | 197万 | 4.4 | 174万 |
| 実施例2-8 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.6 | 211万 | 1.4 | 198万 |
| 実施例2-9 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH- | 1.8 | 183万 | 1.7 | 155万 |
| 実施例2-10 | α | -Phe-Phe-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH- | 1.6 | 189万 | 1.6 | 162万 |
| 実施例2-11 | α | -Phe-Phe-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH- | 1.9 | 192万 | 2.0 | 162万 |
| 実施例2-12 | α | -Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH- | 2.0 | 172万 | 1.9 | 149万 |
| 実施例2-13 | α | -Phe-Phe-NH-C ₅ H ₁₀ -NH- | 1.4 | 214万 | 1.2 | 196万 |
| 実施例2-14 | α | -Phe-Phe-Lys- | 1.4 | 189万 | 1.4 | 172万 |
| 実施例2-15 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 83万 | 1.4 | 80万 |
| 実施例2-16 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 0.5 | 83万 | 0.5 | 81万 |
| 実施例2-17 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 3.4 | 77万 | 3.4 | 76万 |

[0217] [表1-2]

| | | | | | | |
|----------|-----------------|--|-----|------|-----|------|
| 实施例 2-18 | α | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 199万 | 1.4 | 186万 |
| 实施例 2-19 | α | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH- | NT | NT | 1.8 | 144万 |
| 实施例 2-20 | α | -Phe-Gly-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH- | 1.6 | 173万 | 1.6 | 150万 |
| 实施例 2-21 | α | -Phe-Gly-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH- | 2.3 | 150万 | 2.3 | 139万 |
| 实施例 2-22 | α | -Phe-Gly-NH-C ₄ H ₈ O-NH- | 2.0 | 156万 | 2.2 | 140万 |
| 实施例 2-23 | α | -Phe-Pro-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.6 | 166万 | 1.6 | 152万 |
| 实施例 2-24 | α | -Phe- β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | NT | NT | 1.5 | 152万 |
| 实施例 2-25 | α | -Phe- β Ala-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.3 | 209万 | 2.3 | 198万 |
| 实施例 2-26 | α | -Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 213万 | 1.7 | 179万 |
| 实施例 2-27 | α | -Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 192万 | 1.7 | 162万 |
| 实施例 2-28 | α | -Ile-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 231万 | 2.1 | 202万 |
| 实施例 2-29 | α | -Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 201万 | 1.5 | 183万 |
| 实施例 2-30 | α | -Glu-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 226万 | 2.1 | 206万 |
| 实施例 2-31 | α | -Tyr-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.6 | 190万 | 1.7 | 176万 |
| 实施例 2-32 | α | -Trp-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.9 | 187万 | 1.9 | 139万 |
| 实施例 2-33 | α/γ | -Ser-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 186万 | 1.7 | 165万 |
| 实施例 2-34 | α | -Leu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 189万 | 1.6 | 147万 |
| 实施例 2-35 | α | -Val-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 187万 | 1.7 | 156万 |
| 实施例 2-36 | α | -His-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.2 | 191万 | 1.2 | 162万 |
| 实施例 2-37 | α | -Pro-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 167万 | 1.6 | 152万 |
| 实施例 2-38 | α | - β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 191万 | 1.7 | 143万 |
| 实施例 2-39 | γ | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 209万 | 1.5 | 188万 |
| 实施例 2-40 | γ | -Phe-Phe-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH- | 2.1 | 189万 | 2.0 | 176万 |
| 实施例 2-41 | γ | -Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH- | 2.1 | 196万 | 2.1 | 180万 |

[0218] [表1-3]

| | | | | | | |
|----------|-----------------|--|-----|------|-----|------|
| 実施例 2-42 | γ | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 190万 | 1.5 | 172万 |
| 実施例 2-43 | γ | -Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 187万 | 1.7 | 165万 |
| 実施例 2-44 | γ | -Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.6 | 179万 | 1.7 | 149万 |
| 実施例 2-45 | α | -Dphe-DPhe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 148万 | 1.4 | 135万 |
| 実施例 2-46 | γ | -Dphe-DPhe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 160万 | 1.3 | 141万 |
| 実施例 2-47 | α/γ | -Asn-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.3 | 210万 | 1.2 | 178万 |
| 実施例 2-48 | α/γ | -Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C ₆ H ₁₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 206万 | 1.3 | 185万 |
| 実施例 2-49 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | NT | NT | 1.1 | 33万 |
| 実施例 2-50 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.0 | 34万 | 1.9 | 34万 |

[0219] [実験例1]

粘弾性の測定

ヒアルロン酸(分子量190万、80万)と実施例2-1、2-8、2-18、2-27および2-29の結合体の無菌水溶液の粘弾性を、CSL500型ストレス制御式レオメーター(Carr-Med社製)で、直径4cmのコーンを用い、37℃で測定した。図1のように、各結合体は分子量80万と190万のヒアルロン酸の中間の粘弾性を示した。

[0220] [実験例2]

滑膜細胞増殖抑制作用

ヒト滑膜細胞(HFLS)を用いて、TNF- α 刺激による細胞増殖亢進に対する本発明のHA-MTX結合体の影響を検討した。関節リウマチ(RA)の主病巣は、滑膜組織であり、その特徴の一つとして、滑膜細胞が異常増殖して肉芽組織(パンヌス)を形成し、関節の軟骨・骨を破壊することが知られている。また、変形性関節症(OA)でも二次性の滑膜炎が見られる。OAにおいては、RAで見られるような滑膜細胞の著しい増殖変化はないものの、滑膜炎は膝OAの特徴である関節水症や疼痛、熱感といった炎症症状の原因となる(宮坂信之ら編集、「骨・関節疾患」2003年、朝倉書店)。従って、炎症性サイトカインであるTNF- α で亢進した滑膜細胞の増殖を阻害する化合物は、RAおよびOAの病態進行を抑制し、その治療薬となる。

[0221] 被験物質として実施例2のHA-MTX結合体の無菌水溶液(表2)を使用した。HFLS(CA40405、Lot No. :1413, 1493)はCELL APPLICATIONS INS. よ

り購入して使用した。

- [0222] HFLSは96穴プレート(Falcon)に5000cells/wellで播種して5%FBS、1x Antibiotic-Antimycotic(GIBCO)含有Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)培地にて3時間培養した。細胞付着後、TNF- α (最終濃度10ng/mL)、各濃度のHA-MTX結合体を添加して5日間培養した。培養終了2日前に、37kBq/wellの $[^3\text{H}]$ -デオキシウリジン(MORAVEK)を加え、細胞内への $[^3\text{H}]$ -デオキシウリジン取り込み量(放射活性)をシンチレーションカウンターで測定した。細胞の回収は0.05%トリプシン-0.2%EDTAで細胞を剥がして行った。
- [0223] 各実験で測定した各被験物質の放射活性は、被験物質を添加せず培養した群の放射活性をcontrolとして、相対値(% of control)を算出した。HA-MTX結合体のMTX濃度は、ヒアルロン酸1mg/mLあたりフリーのカルボキシル基が $2.49 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (1g/401/L:401はN-アセチルグルコサミン+グルクロン酸の分子量)であることから、この値にMTXの結合率を乗して算出した。(MTX結合率1%のHA-MTX結合体1mg/mL場合、MTX濃度は $2.49 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ とした。)得られた値を使用して4 parameter logistic 法(解析ソフトGraphPad Prism 3.02)により細胞増殖阻害活性(IC₅₀ 値)を算出した。
- [0224] HFLSにおけるHA-MTX結合体のIC₅₀ 値を表2に示す。
- [0225] [表2-1]

表2 TNF- α 刺激したヒト滑膜細胞の増殖抑制作用

| | 結合位置 | ペプチド鎖を含有するリンカー | MTXの 結合率 (%) | 結合体の 分子量 (ダルトン) | IC ₅₀ |
|---------|---------------------|---|--------------------|-----------------------|------------------|
| | (α/γ) | | | | (mol/L) |
| 実施例2-1 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 186万 | 3.6E-07 |
| 実施例2-2 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.9 | 218万 | 1.4E-07 |
| 実施例2-2' | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.3 | 206万 | 7.2E-07 |
| 実施例2-4 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.1 | 223万 | 1.1E-05 |
| 実施例2-5 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.3 | 209万 | 1.1E-06 |
| 実施例2-6 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 3.8 | 191万 | 9.1E-08 |
| 実施例2-8 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 198万 | 8.4E-07 |
| 実施例2-9 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH- | 1.7 | 155万 | 1.3E-06 |
| 実施例2-10 | α | -Phe-Phe-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH- | 1.6 | 162万 | 1.2E-06 |
| 実施例2-11 | α | -Phe-Phe-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH- | 2.0 | 162万 | 2.5E-07 |
| 実施例2-12 | α | -Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH- | 1.9 | 149万 | 3.0E-07 |
| 実施例2-13 | α | -Phe-Phe-NH-C ₅ H ₁₀ -NH- | 1.2 | 196万 | 1.5E-06 |
| 実施例2-14 | α | -Phe-Phe-Lys- | 1.4 | 172万 | 1.5E-05 |
| 実施例2-15 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 80万 | 4.8E-07 |
| 実施例2-16 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 0.5 | 81万 | 1.3E-05 |
| 実施例2-17 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 3.4 | 76万 | 1.3E-05 |
| 実施例2-18 | α | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 186万 | 9.2E-06 |
| 実施例2-19 | α | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₂ -NH- | 1.8 | 144万 | 5.4E-06 |

[0226] [表2-2]

| | | | | | |
|----------|-----------------|--|-----|------|---------|
| 実施例 2-20 | α | -Phe-Gly-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH- | 1.6 | 150万 | 1.8E-05 |
| 実施例 2-21 | α | -Phe-Gly-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH- | 2.3 | 139万 | 8.3E-07 |
| 実施例 2-22 | α | -Phe-Gly-NH-C ₄ H ₈ O-NH- | 2.2 | 140万 | 3.0E-06 |
| 実施例 2-23 | α | -Phe-Pro-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.6 | 152万 | 1.2E-05 |
| 実施例 2-24 | α | -Phe- β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 152万 | 3.5E-06 |
| 実施例 2-25 | α | -Phe- β Ala-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.3 | 198万 | 2.9E-07 |
| 実施例 2-26 | α | -Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 179万 | 1.7E-06 |
| 実施例 2-27 | α | -Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 162万 | 3.1E-06 |
| 実施例 2-28 | α | -Ile-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 202万 | 1.2E-05 |
| 実施例 2-29 | α | -Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 183万 | 8.4E-06 |
| 実施例 2-30 | α | -Glu-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 206万 | 5.4E-05 |
| 実施例 2-31 | α | -Tyr-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 176万 | 7.0E-06 |
| 実施例 2-32 | α | -Trp-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.9 | 139万 | 4.7E-06 |
| 実施例 2-33 | α | -Ser-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 165万 | 3.6E-05 |
| 実施例 2-34 | α | -Leu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.6 | 147万 | 3.6E-06 |
| 実施例 2-35 | α | -Val-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 156万 | 1.1E-05 |
| 実施例 2-36 | α | -His-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.2 | 162万 | 1.7E-05 |
| 実施例 2-39 | γ | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 188万 | 3.2E-06 |
| 実施例 2-42 | γ | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 172万 | 1.4E-05 |
| 実施例 2-47 | α/γ | -Asn-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.2 | 178万 | 1.1E-06 |
| 実施例 2-48 | α/γ | -Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.3 | 185万 | 1.3E-06 |
| 実施例 2-49 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.1 | 33万 | 1.3E-05 |
| MTX単独 | - | - | - | | 5.5E-08 |

[0227] 表2の結果より、検討したHA-MTX結合体はいずれもTNF- α 刺激によるHFLSの細胞増殖亢進を抑制する作用を有することが確認された。

[0228] [実験例3]

mBSA誘導単関節炎モデルに対する膝関節腫脹抑制効果

本発明のHA-MTX結合体のin vivoでの滑膜炎抑制作用を、ラットmethylated bovine serum albumin (mBSA)誘導単関節炎モデルの膝関節腫脹の抑制効果にて

評価した。本実験例で用いられたmBSA誘導関節炎モデルは、抗原誘発関節炎モデルとして汎用されるものであり、滑膜炎を誘発することが知られている(Sven E. Andersson, et al, The Journal of Rheumatology(1998) 25: 9, 1772-7)ことから、本モデルで認められるin vivoにおける膝関節腫張の抑制効果は、滑膜炎抑制作用であると考えることができる。滑膜炎をin vivoで抑制する本発明化合物は、滑膜炎を伴う関節疾患(RAやOAなど)の治療薬として有用である。

- [0229] 動物はLEW/Crj系ラット(日本チャールズ・リバー、6週齢、雄)を使用した。関節炎を誘導する21日および14日前に、2mg/mLのmBSA(Calbiochem)水溶液と等量のFreund's complete adjuvant(Difco)で作製した乳濁液0.5mLをラットのわき腹に皮下投与した。関節炎は2mg/mLのmBSA水溶液50 μ Lを右膝関節内投与して誘導した。左膝関節は無処置で各個体のコントロールとした。被験物質(無菌水溶液)および対照薬であるヒアルロン酸は関節炎誘導7日および1日前と7日後に、50 μ Lを右膝関節内投与した。
- [0230] 膝関節腫張の測定は両膝関節の幅をノギスで測定して、左右差(右膝直径-左膝直径)を膝関節腫張とした。関節炎誘導直前より2週間後まで週2回の頻度で膝関節幅を測定して、その経時的推移からAUC(Area Under the Curveの略。曲線下面積ともいう。ここでは、関節腫張の経時的曲線下の面積を示す。)を算出した。測定時ごとにAUCの平均値および標準偏差を算出し、被検物質投与群とHA投与群間で対応のないt検定を行い、危険率5%未満の場合に有意差ありと判断した。統計解析はSAS version 6.12(SASインスティテュートジャパン)を使用した。また、各被験物質のAUCはHA投与群をcontrolとして、各被験物質の相対値(% of control)を算出した。
- [0231] 本発明の各HA-MTX結合体の効果を上記の方法で検討した結果を表3に示す。
- [0232] [表3-1]

表3 mBSA誘導単関節炎モデルの関節腫脹に対するHA-MTX結合体の抑制作用

| | 結合位置 (α/γ) | ペプチド鎖を含有するリンカー | MTXの 結合率 (%) | 結合体の 分子量 (ダルトン) | AUC (% of control) (mean \pm SEM) | P値 |
|---------|-----------------------------|---|--------------------|-----------------------|---|----------|
| 実施例2-1 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 186万 | 48.5 \pm 5.3 | P<0.0001 |
| 実施例2-2 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.9 | 218万 | 45.0 \pm 6.8 | P<0.0001 |
| 実施例2-2' | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.3 | 206万 | 65.5 \pm 7.5 | P<0.005 |
| 実施例2-3 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 0.5 | 217万 | 76.2 \pm 7.7 | P<0.05 |
| 実施例2-4 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.1 | 223万 | 69.0 \pm 6.5 | P<0.005 |
| 実施例2-5 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 1.3 | 209万 | 51.7 \pm 3.8 | P<0.0001 |
| 実施例2-6 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 3.8 | 191万 | 41.6 \pm 7.6 | P<0.0001 |
| 実施例2-7 | α | -Phe-Phe-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 4.4 | 174万 | 46.5 \pm 4.8 | P<0.0001 |
| 実施例2-8 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 198万 | 54.9 \pm 7.2 | P<0.005 |
| 実施例2-10 | α | -Phe-Phe-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH- | 1.6 | 162万 | 63.7 \pm 9.1 | P<0.05 |
| 実施例2-13 | α | -Phe-Phe-NH-C ₆ H ₁₀ -NH- | 1.2 | 196万 | 60.5 \pm 9.9 | P<0.01 |
| 実施例2-14 | α | -Phe-Phe-Lys- | 1.4 | 172万 | 54.3 \pm 7.4 | P<0.0005 |
| 実施例2-17 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 3.4 | 76万 | 56.1 \pm 8.2 | P<0.01 |
| 実施例2-18 | α | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 186万 | 61.5 \pm 4.7 | P<0.005 |
| 実施例2-20 | α | -Phe-Gly-NH-C ₈ H ₁₆ O ₂ -NH- | 1.6 | 150万 | 65.3 \pm 9.6 | P<0.01 |
| 実施例2-21 | α | -Phe-Gly-NH-C ₆ H ₁₂ O ₂ -NH- | 2.3 | 139万 | 47.4 \pm 8.8 | P<0.0005 |
| 実施例2-27 | α | -Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 162万 | 75.1 \pm 6.8 | P<0.05 |
| 実施例2-28 | α | -Ile-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 202万 | 63.5 \pm 4.7 | P<0.005 |
| 実施例2-29 | α | -Glu-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.5 | 183万 | 68.8 \pm 6.7 | P<0.005 |

[0233] [表3-2]

| | | | | | | |
|---------|-----------------|---|-----|------|-----------------|---------|
| 実施例2-30 | α | -Glu-NH-C ₂ H ₄ -NH- | 2.1 | 206万 | 58.3 \pm 7.4 | P<0.005 |
| 実施例2-31 | α | -Tyr-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 176万 | 67.7 \pm 6.2 | P<0.005 |
| 実施例2-38 | α | - β Ala-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 143万 | 69.3 \pm 4.2 | P<0.001 |
| 実施例2-41 | α | -Phe-Phe-NH-C ₄ H ₈ O-NH- | 2.1 | 180万 | 67.1 \pm 8.3 | P<0.05 |
| 実施例2-47 | α/γ | -Asn-Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.2 | 178万 | 42.1 \pm 6.3 | P<0.001 |
| 実施例2-48 | α/γ | -Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.3 | 185万 | 58.8 \pm 11.6 | P<0.05 |

[0234] 表3に示される結果より、今回検討したHA-MTX結合体はいずれも、HA投与群

に比べ、関節炎モデルの膝関節腫脹を有意に抑制することが明らかとなった。また、HAに結合するMTXの結合率の影響に注目すると、MTXの結合率が0.5から4.4% (実施例1〜7) で、関節炎モデルの膝関節腫脹をHA投与群に比べて有意に抑制することが示唆された。

[0235] [実験例4]

実験例3の方法に従い、本発明のHA-MTX結合体の有用性を検証する目的で、1) 実施例2-2で調製したHA-MTX結合体(無菌水溶液)の投与群、2) そのHA-MTX結合体が含有するMTXと同量のMTXを含む溶液の投与群、および3) その結合体が含有するのと同量のMTXおよびヒアルロン酸(HA)の混合物(HA+MTX)の投与群の間で関節腫脹抑制作用を比較した。本試験の膝関節腫脹の経時的推移を図2に、及びそのAUCを図3に示す。図2および図3に示される結果より、MTX単体およびMTXとHAの混合物に比べ、HA-MTX結合体は、関節炎モデルの関節腫脹に対する著しく強い抑制作用を有することが確認された。従って、MTXとHAとの結合は、MTXの関節腫脹抑制作用を著しく向上させることが明らかとなった。

[0236] 以上のことより、本発明のHA-MTX結合体は、HAには認められないin vitroでのTNF- α 刺激によるヒト滑膜細胞の増殖抑制作用、in vivoでの関節炎を発症するモデルの滑膜炎を軽減する作用を有することが明らかとなった。また、関節炎モデルにおいては、MTX単独およびHAとMTXの混合物では十分な滑膜炎の軽減作用が認められないのに対し、HA-MTX結合体は強力な滑膜炎の軽減作用を発揮することが明らかとなった。

[0237] [実験例5]

コラーゲン関節炎モデルに対する影響

HA-MTX結合体のin vivoにおける滑膜炎抑制作用を、関節リウマチ(RA)のモデルとして汎用されるラットコラーゲン関節炎モデル(金ら、「関節外科」(1998)、Vol. 17, No. 2, 111-21)にて評価した。本モデルで炎症を抑制する本発明化合物は、RAに代表される自己抗原誘発免疫疾患の治療に有用である。

[0238] 動物はDA/Slcラット(日本エスエルシー(株)、11週齢、メス)を使用した。ウシII型コラーゲン(コラーゲン技術研修会)を0.01mol/L酢酸水溶液に1.5mg/mL

となるように溶解して、これに等量のFreund's incomplete adjuvant (Difco)を加えて乳濁液を作製した。この乳濁液をラットの背部皮内4ヵ所に1ヵ所当たり約0.1mLで合計0.4mL投与し、関節炎を誘発した。被験物質(無菌水溶液)および対照薬であるヒアルロン酸(HA)と生理食塩水(Saline)は、感作日より、5日に1回の割合で、50 μ Lを右膝関節内にのみ投与を行った。左膝関節は無処置とした。また、病態モデルの対照として、関節炎を誘導しない動物(Normal)の右膝関節内に生理食塩水を投与した。

[0239] 膝関節腫脹の変化は両膝の関節幅をノギスで測定して正常群の関節幅と比較することで観察した。関節炎誘導直前より23日後まで、週2回程度の割合で観察した。膝関節幅の測定値については、測定時ごとに平均値および標準誤差を算出し、被験物質群とHA投与群間で対応のないt検定を行い、危険率5%未満の場合に有意差ありと判断した。統計解析はSAS version 8.02(SASインスティテュートジャパン)を使用した。

[0240] 本発明のHA-MTX結合体の効果を上記の方法で検討した結果を図4に示す。

[0241] 図4に示される結果より、本発明のHA-MTX結合体はHA投与群に比べ、コラーゲン関節炎の誘導により腫脹した関節幅を有意に抑制し、その関節幅の経時的推移は、正常群とほぼ同等レベルであった。また、この効果は、HA-MTX結合体を投与した部位(右膝)においてのみ観察され、非投与部位(左膝)においては認められなかった。このように、本化合物が、投与部位に局限して、作用を発現できることが明らかとなった。

[0242] [実験例6]

コラゲナーゼ誘導関節炎(OA)モデルに対する関節腫脹抑制効果

HA-MTX結合体のin vivoにおける滑膜炎抑制作用を、コラゲナーゼ誘導OAモデルラットにて評価した。コラゲナーゼ誘導OAモデルは、関節内にコラゲナーゼを注入することにより、軟骨組織のコラーゲンを直接消化して、関節内で炎症を誘発するモデルである。このモデルは関節軟骨変性や滑膜炎などのヒトOA病態と類似した病理組織学的変化を示し、OA治療薬の評価に有用である(Takanori K, et al., Osteoarthritis and Cartilage (1998)6, 177-86)。したがって、本モデルの炎症を抑制

し、かつ軟骨変性を抑制する本発明化合物はOA治療薬として有用である。

[0243] 動物はSD／Crj系ラット(日本チャールズ・リバー、6週齢、雄)を使用した。1. 5% Collagenase (SIGMA)溶液50 μ Lを右膝関節腔内に投与して関節炎を誘導した。左膝関節は、各個体のコントロールとするために無処置にした。被験物質は関節炎誘導の7および1日前より、週1回の割合で50 μ Lを右膝関節内に投与した。

[0244] 膝関節腫脹の測定は、両膝関節の幅をノギスで測定して、その左右差(右膝直径－左膝直径)を求めて膝関節腫脹とした。関節炎誘導直前より20日後まで、週2回程度の頻度で膝関節幅を測定して、その経時的推移を示すグラフのAUCを算出した。測定時ごとにAUCの平均値および標準誤差を算出し、被験物質投与群とHA投与群間で対応のないt検定を行い、危険率5%未満の場合に有意差ありと判断した。

[0245] 本発明のHA-MTX結合体の効果を上記の方法で検討した結果を図5と表4に示す。図5にHA-MTX結合体の典型的な関節腫脹の経時変化を示し、表4に検討した被験物質の結果を示した。

[0246] [表4]

表4 コラゲナーゼ誘導関節炎(OA)モデルの関節腫脹に対するHA-MTX 結合体の抑制作用

| | 結合位置 (α/γ) | ペプチド鎖を含有するリンカー | MTXの 結合率 (%) | 結合体の 分子量 (ダルトン) | AUC (% of control) (mean \pm SEM) | P値 |
|---------|-----------------------------|---|--------------------|-----------------------|---|----------|
| 実施例2-1 | α | -Phe-Phe-NH-C ₃ H ₄ -NH- | 2.1 | 186万 | 45.7 \pm 3.9 | P<0.0001 |
| 実施例2-2 | α | -Phe-Phe-NH-C ₃ H ₄ -NH- | 1.9 | 218万 | 48.9 \pm 3.7 | P<0.001 |
| 実施例2-8 | α | -Phe-Phe-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 198万 | 54.8 \pm 5.9 | P<0.0001 |
| 実施例2-18 | α | -Phe-Gly-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.4 | 186万 | 65.9 \pm 3.5 | P<0.0001 |
| 実施例2-27 | α | -Ile-NH-C ₁₀ H ₂₀ O ₃ -NH- | 1.7 | 162万 | 82.6 \pm 5.2 | P<0.05 |

[0247] これらの結果より、今回検討したHA-MTX結合体はいずれもHA投与群に比べ、コラゲナーゼ誘導関節炎モデルの関節腫脹を有意に抑制することが明らかとなった。

[0248] [実験例7]

コラゲナーゼ誘導関節炎(OA)モデルに対する関節軟骨破壊抑制効果

実験例6の冒頭に記載したように、コラゲナーゼ誘導OAモデルはOA治療薬の評価に有用であることが知られており、本モデルの炎症を抑制し、かつ軟骨変性を抑制する化合物はOA治療薬として有用である。

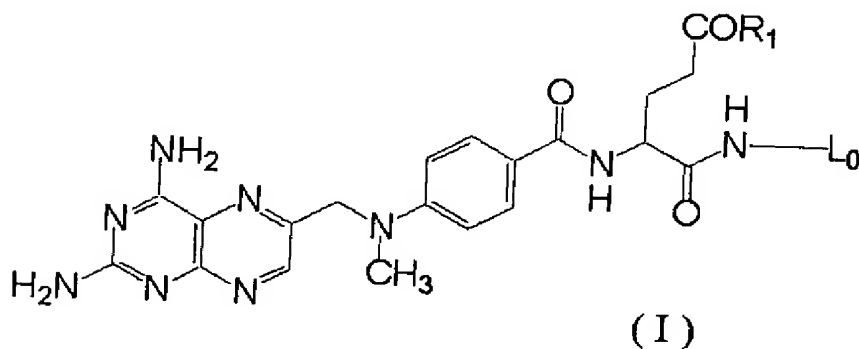
- [0249] 動物はSD／Crj系ラット(日本チャールズ・リバー、6週齢、雄)を使用した。1. 5% Collagenase (SIGMA)溶液50 μ Lを右膝関節腔内に投与して関節炎を誘導した。左膝関節は、各個体のコントロールとするため無処置にした。被験物質と対照の生理食塩水は、関節炎誘導の7および1日前より、週1回の割合で50 μ Lを右膝へ関節内投与した。
- [0250] 膝関節軟骨の破壊の程度を評価するために、関節炎誘導後28日目に右膝関節を採取して、下腿骨内顆部の関節軟骨の変性像を走査型電子顕微鏡(SEM)にて撮影した。撮影後、盲検化を行い、各個体のSEM像から関節軟骨変性の程度に順位付けを行った。データを固定した後、盲検化を開錠して、各群の順位平均を算出した。生理食塩水投与群と被験物質投与群との間で、Wilcoxon検定を行い、危険率5%未満を有意とした。統計解析はSAS version 8.02(SASインスティテュートジャパン)を使用した。
- [0251] 本発明のHA-MTX結合体の効果を上記の方法で検討した結果を図6に示す。
- [0252] 図6に示される結果より、本発明のHA-MTX結合体は、生理食塩水投与群に比べ、コラゲナーゼ誘導OAモデルの軟骨変性を有意に抑制した。この結果より、HA-MTX結合体が関節炎モデルの関節腫脹のみならず、関節軟骨の破壊をも抑制できることが明らかとなった。したがって、本発明のHA-MTX結合体は、関節軟骨変性あるいは関節軟骨欠損を伴う関節疾患の治療に有用であり得る。

産業上の利用可能性

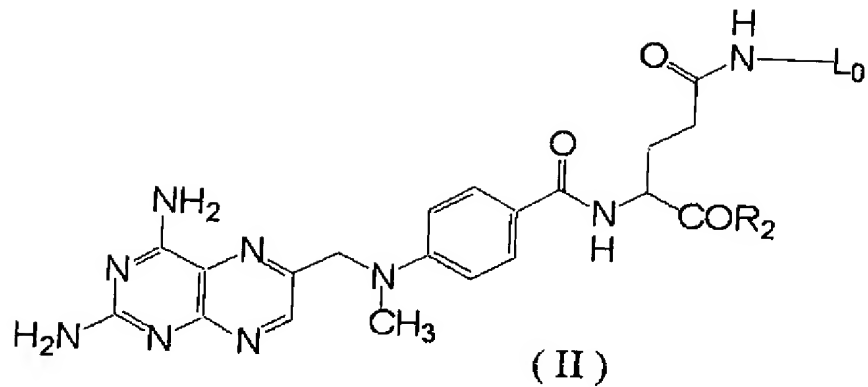
- [0253] 本発明のHA-MTX結合体により、関節注入剤としてのHAの側面を持ちながら、MTXの滑膜炎抑制作用を投与関節内でのみ安全に発現させることができる、従来にはない効果を有する、優れた関節疾患治療薬が提供される。

請求の範囲

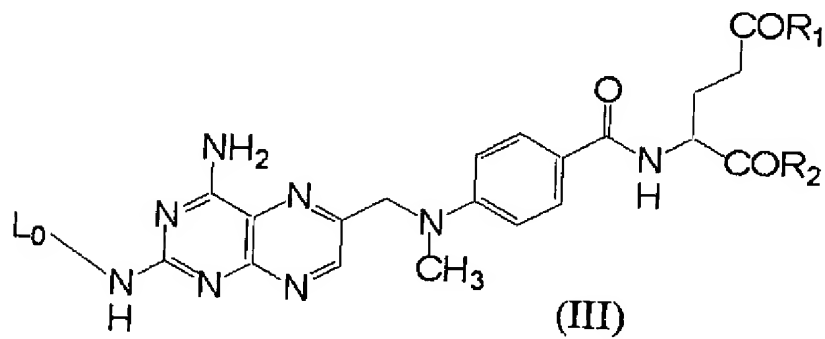
- [1] ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体またはそれらの塩のカルボキシル基に、1〜8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合した、ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。
- [2] リンカーが、1〜8個のアミノ酸からなるペプチド鎖、ならびにC₂₋₂₀アルキレンジアミン鎖を含み、当該アルキレンジアミン鎖は、1〜5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基またはC₁₋₆アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい、請求項1に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。
- [3] ヒアルロン酸の総カルボキシル基に対するメトトレキサートの結合率が0.5%〜4.5%である、請求項1または2に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。
- [4] ヒアルロン酸の分子量が60万ダルトン以上である請求項1〜3のいずれか1項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。
- [5] リンカーに結合したメトトレキサートが、式(I)、(II)、(III)または(IV)：
- [化1]



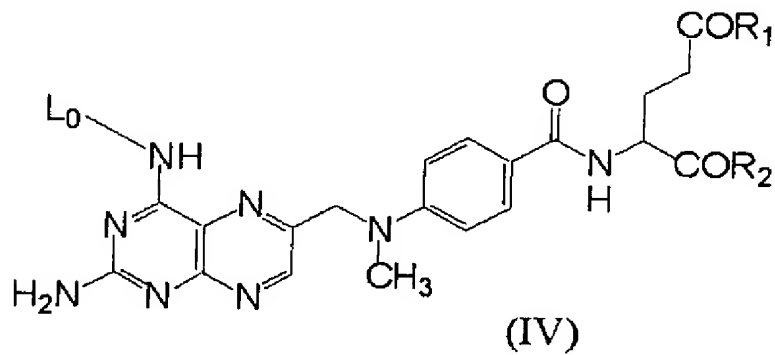
[化2]



[化3]



[化4]

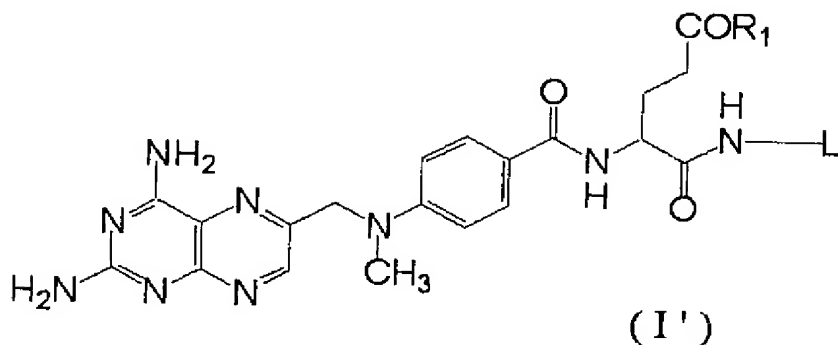


[式中、R₁およびR₂はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、C₁₋₆アルコキシ基、C₁₋₆アルキルアミノ基、またはジ-C₁₋₆アルキルアミノ基であり；
L₀は、リンカーの結合位置である。]

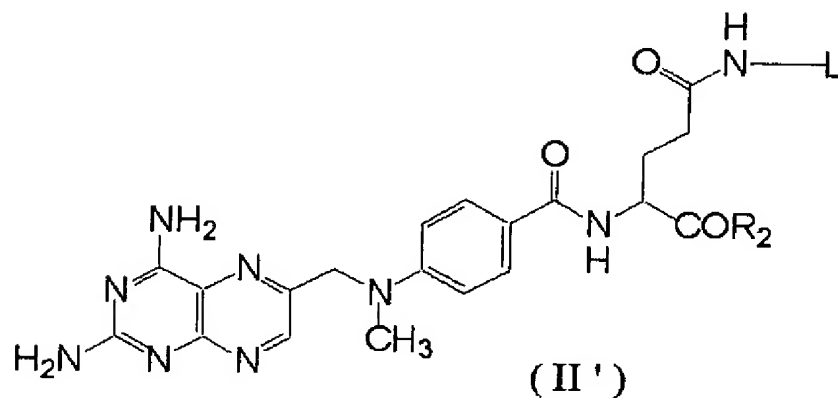
で表される、請求項1〜4のいずれか1項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。

- [6] ペプチド鎖を含有するリンカーおよび当該リンカーに結合したメトトレキサートが、式(I')または(II'):

[化5]



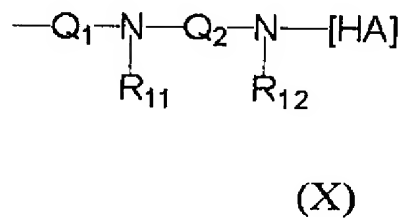
[化6]



[式中、 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、またはジ- C_{1-6} アルキルアミノ基であり;

Lは、式(X)

[化7]



(式中、 Q_1 は結合する-NH-と一緒に1-8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を

形成し、当該ペプチド鎖に含まれるアミノ酸の各残基は、独立に、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルスルホニル基、および C_{6-10} アリールスルホニル基からなる群から選択される、1個以上の基により置換または保護されていてもよく、当該ペプチド鎖に含まれる各アミド結合は、独立に1個以上の C_{1-6} アルキル基および／または C_{1-6} アルキルカルボニル基で窒素原子上を置換されていてもよく、当該残基に含まれる各カルボキシル基は、独立に1または2個の C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

R_{11} および R_{12} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-6} アルキル基であり；

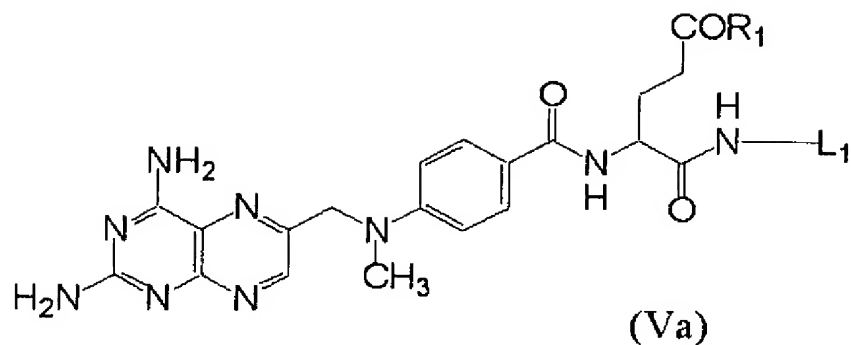
Q は C_{2-20} アルキレンであり、当該アルキレンは1〜5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基または C_{1-6} アルコキシカルボニル基で置換されていてもよく；および

[HA]はヒアルロン酸との結合位置を表し、当該リンカーは当該ヒアルロン酸に含まれるカルボキシル基とアミド結合を形成する。)で表されるリンカーである。]

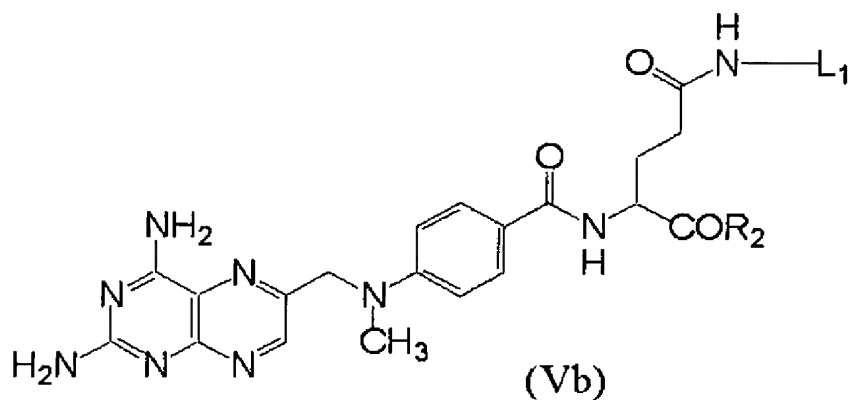
で表される、請求項1〜4のいずれか1項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。

- [7] 請求項1〜6のいずれか1項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を有効成分として含有する医薬組成物。
- [8] 請求項1〜6のいずれか1項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を有効成分として含有する関節疾患治療薬。
- [9] 関節局所投与製剤である請求項8記載の関節疾患治療薬。
- [10] 式(Va)または(Vb)：

[化8]

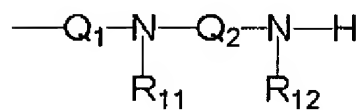


[化9]



[式中、 R_1 および R_2 はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、またはジ- C_{1-6} アルキルアミノ基であり；
 L_1 は、式 (X')]

[化10]



(X')

(式中、 Q_1 は結合する—NH—と一緒に1～8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成し、当該ペプチド鎖に含まれるアミノ酸の各残基は、独立に、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルカルボニル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、ホルミル基、 C_{1-6} アルキルス

ルホニル基、および C_{6-10} アリールスルホニル基からなる群から選択される、1個以上の基により置換または保護されていてもよく、当該ペプチド鎖に含まれる各アミド結合は、独立に1個以上の C_{1-6} アルキル基および／または C_{1-6} アルキルカルボニル基で窒素原子上を置換されていてもよく、当該残基に含まれる各カルボキシル基は、独立に1または2個の C_{1-6} アルキルで置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

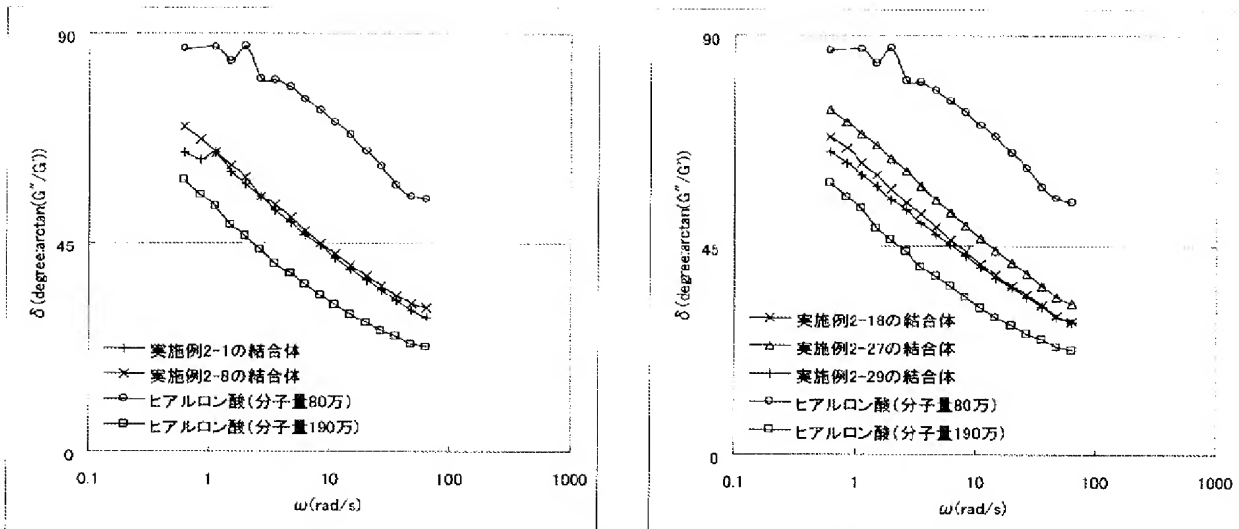
R_{11} および R_{12} はそれぞれ独立に水素原子または C_{1-6} アルキルであり；

Q は C_{2-20} アルキレンであり、当該アルキレンは1〜5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基または C_{1-6} アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい。)である。]

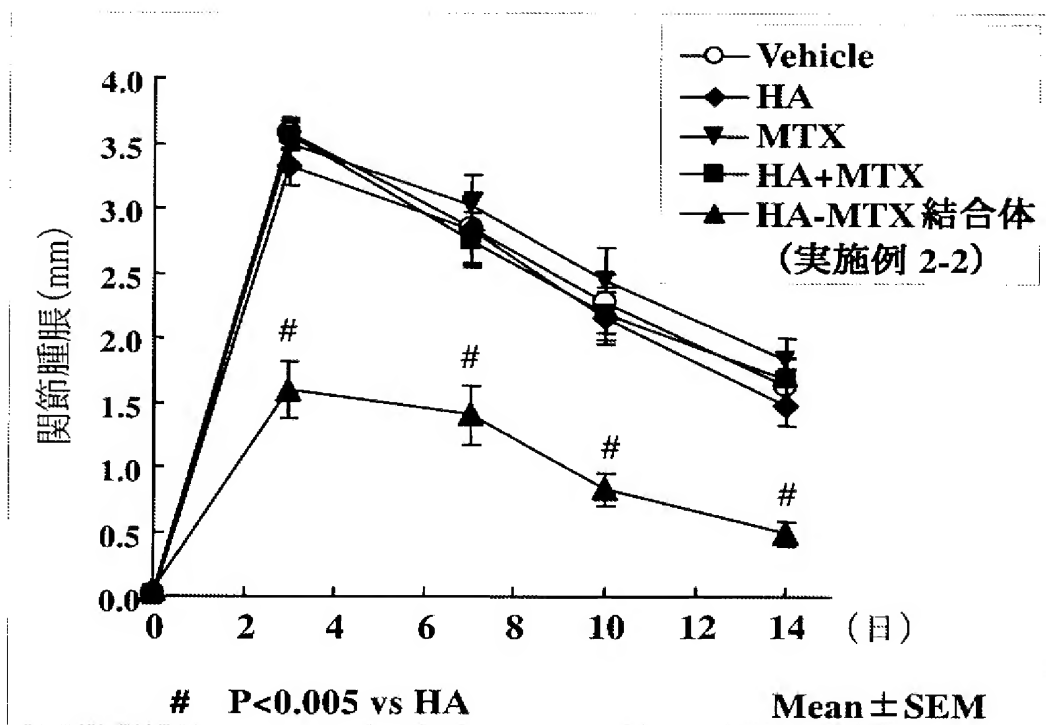
の化合物。

- [11] 請求項10に記載の式(Va)または(Vb)の化合物をヒアルロン酸と反応させ、当該ヒアルロン酸のカルボキシル基をN-置換アミド基に変換する工程を含む、請求項1に記載のヒアルロン酸-メトレキサート結合体の製造方法。

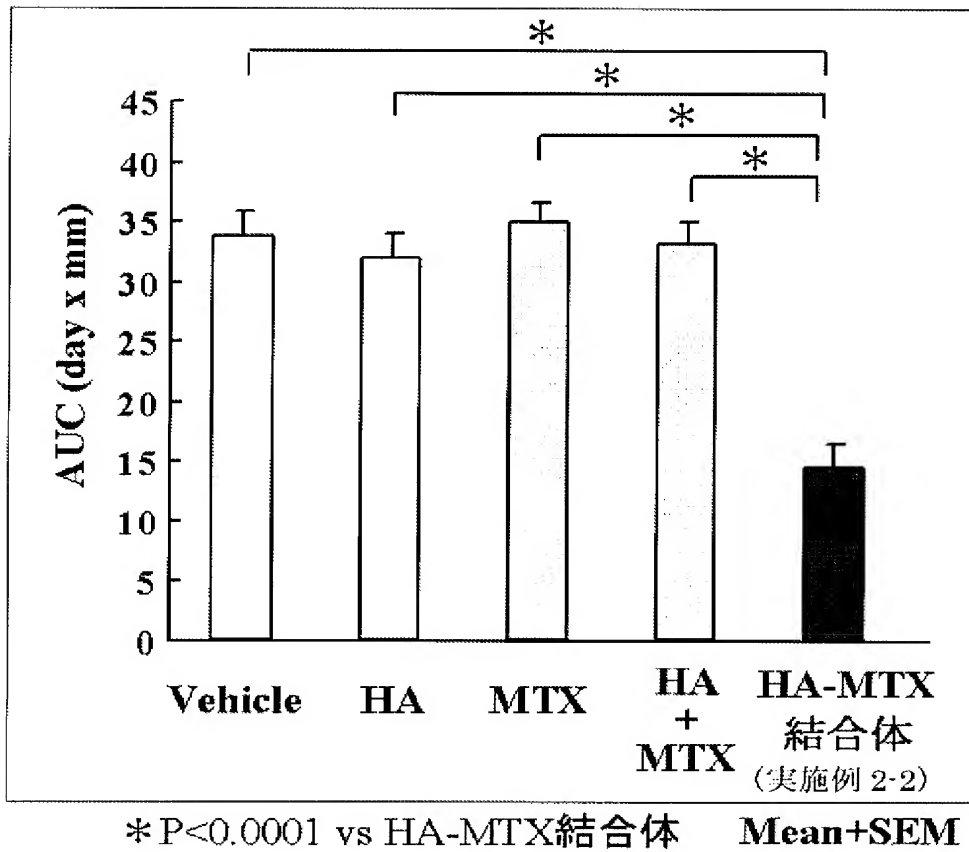
[図1]



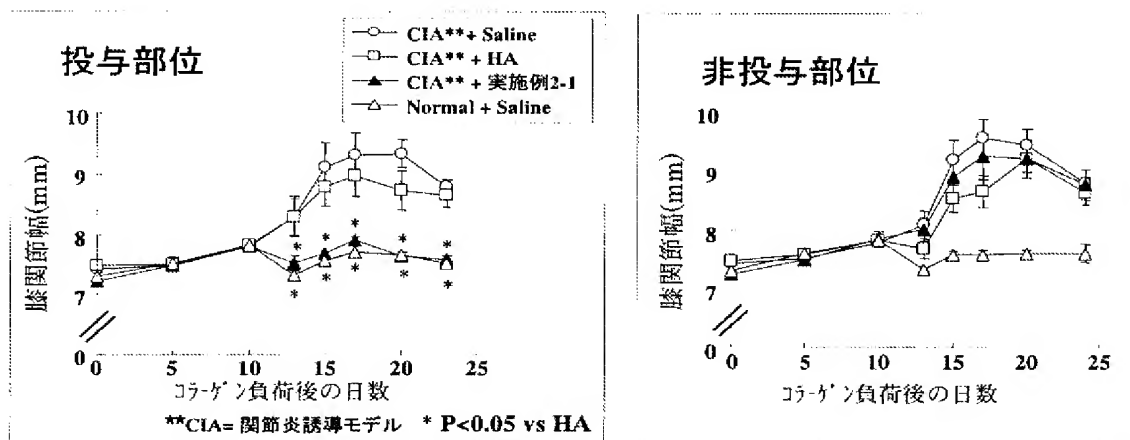
[図2]



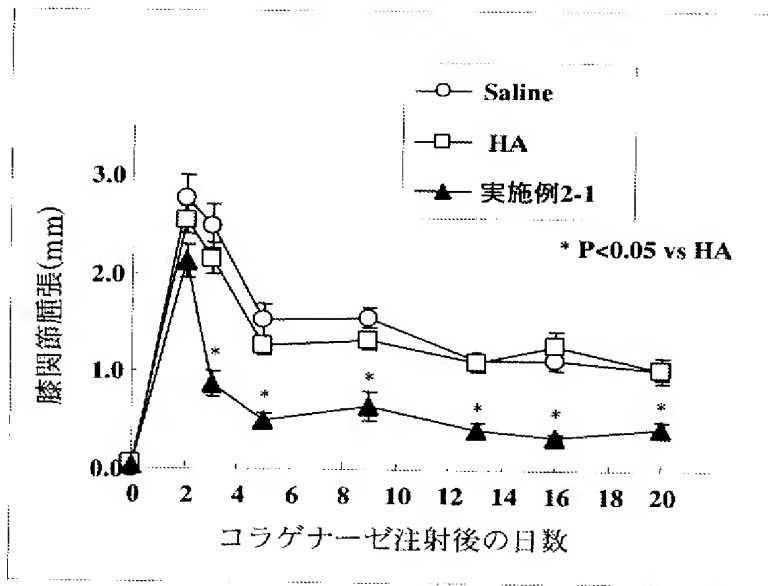
[図3]



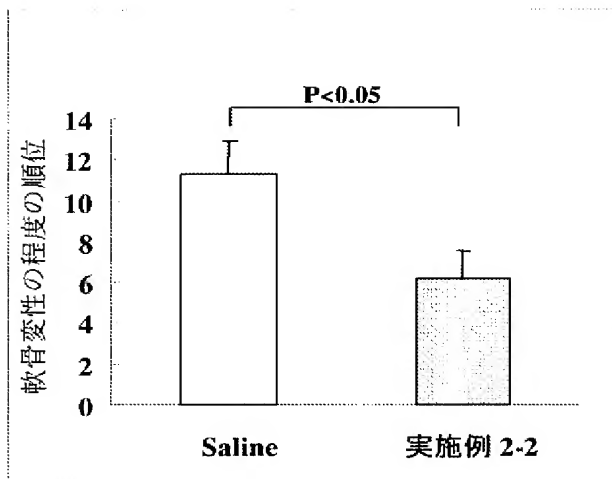
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08B37/08, A61K31/519, 47/48, A61P19/02//C07D475/10, C07K5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C08B37/08, A61K31/519, 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2005 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2005 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2005 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X Y | WO 1994/019376 A1 (Drug Delivery System Institute, Ltd.), 01 September, 1994 (01.09.94), Full text & US 5688931 A & EP 640622 A1 & CA 2134348 A | 1, 3-5, 7 8, 9 |
| X | JP 2002-542304 A (Bekutoreimudo Inc.), 10 December, 2002 (10.12.02), Page 83 & EP 1176985 A1 & WO 2000/064486 A2 & CA 2369999 A | 10 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
20 April, 2005 (20.04.05)

Date of mailing of the international search report
17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003739

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | JP 8-507750 A (The Wellcome Foundation Ltd.), 20 August, 1996 (20.08.96), Page 40 & EP 675737 A1 & WO 1994/013327 A1 & AU 5984094 A & CA 2151614 A | 10 |
| X | ROSOWSKY, Andre et al., Methotrexate Analogs. 23. Synthesis, Dihydrofolate Reductase Affinity, Cytotoxicity, and in Vivo Antitumor Activity of Some putative Degradation Products of Methotrexate-Poly (L-lysine) Conjugates, Journal of Medicinal Chemistry, 1984, Vol.27, No.7, pages 888 to 893 | 10 |
| Y | JP 11-222425 A (SSP Co., Ltd.), 17 August, 1999 (17.08.99), Claims & US 6197326 B1 & US 6428804 B1 & EP 911025 A1 | 8,9 |
| A | JP 9-188705 A (Seikagaku Corp.), 22 July, 1997 (22.07.97), Claims (Family: none) | 1-11 |
| A | JP 6-80705 A (Drug Delivery System Institute, Ltd.), 22 March, 1994 (22.03.94), Claims (Family: none) | 1-11 |
| A | JP 8-85703 A (Drug Delivery System Institute, Ltd.), 02 April, 1996 (02.04.96), Claims (Family: none) | 1-11 |
| A | JP 64-40499 A (Teijin Ltd.), 10 February, 1989 (10.02.89), Full text (Family: none) | 10 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C08B37/08, A61K31/519, 47/48, A61P19/02 //C07D475/10, C07K5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C08B37/08, A61K31/519, 47/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2005年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2005年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2005年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (STN) MEDLINE (STN) CAPLUS (STN) REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|-------------------|
| X Y | WO 1994/019376 A1 (株式会社ディ・ディ・エス研究所) 1994. 09. 01, 全文 & US 5688931 A & EP 640622 A1 & CA 2134348 A | 1, 3-5, 7 8, 9 |
| X | JP 2002-542304 A (ベクトレイムド インコーポレイテッド) 2002. 12. 10, 第 83 頁 & EP 1176985 A1 & WO 2000/064486 A2 & CA 2369999 A | 10 |
| X | JP 8-507750 A (ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リミテッド) 1996. 08. 20, 第 40 頁 & EP 675737 A1 & WO 1994/013327 A1 | 10 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4C

8619

關 政立

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| | & AU 5984094 A & CA 2151614 A | |
| X | ROSOWSKY, Andre et al., Methotrexate Analogs. 23. Synthesis, Dihydrofolate Reductase Affinity, Cytotoxicity, and in Vivo Antitumor Activity of Some Putative Degradation Products of Methotrexate-Poly (L-lysine) Conjugates, Journal of Medicinal Chemistry, 1984, Vol. 27, No. 7, p888-893 | 10 |
| Y | JP 11-222425 A(エスエス製薬株式会社)1999. 08. 17, 特許請求の範囲 & US 6197326 B1 & US 6428804 B1 & EP 911025 A1 | 8, 9 |
| A | JP 9-188705 A(生化学工業株式会社)1997. 07. 22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし) | 1-11 |
| A | JP 6-80705 A(株式会社ディ・ディ・エス研究所)1994. 03. 22, 特許請求の範囲 (ファミリーなし) | 1-11 |
| A | JP 8-85703 A(株式会社ディ・ディ・エス研究所)1996. 04. 02, 特許請求の範囲 (ファミリーなし) | 1-11 |
| A | JP 64-40499 A(帝人株式会社)1989. 02. 10, 全文 (ファミリーなし) | 10 |